

Nilai LD₅₀ dan LC₅₀ Ekstrak Etanol Herba Ketumpangan Air (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth)

(LD₅₀ and LC₅₀ Values of Ethanol Extracts From Herbs of Ketumpangan Air (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth))

INDAH DWIATMI DEWIJANTI^{1*}, MARISSA ANGELINA¹, SRI HARTATI¹,
BETTY ERNAWATI DEWI², LIA MEILAWATI¹

¹Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Diterima 4 April 2014, Disetujui 14 Agustus 2014

Abstrak: Ketumpangan air (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) merupakan tumbuhan liar yang tersebar luas di setiap daerah di Indonesia dan biasa hidup ditempat teduh atau lembab. Tanaman ini dapat dikonsumsi sebagai lalapan. Secara empiris ketumpangan air digunakan dalam pengobatan demam, penyakit perut, gangguan ginjal, obat abses, bisul jerawat, sakit kepala, mengurangi nyeri pada rematik dan rematik gout atau pengobatan luar lainnya. Pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut dengan menggunakan hewan coba mencit strain DDY. Selain itu juga dilakukan pengujian toksisitas BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Tujuan dari penelitian ini agar dapat nilai LD₅₀ dan LC₅₀ ekstrak etanol herba Ketumpangan air. Hasil dari pengujian *P. pellucida* dikategorikan toksik ringan dimana perhitungan LD₅₀ dengan cara Reed dan Munich menunjukkan bahwa nilai LD₅₀ kelompok jantan sebesar 15,13 g/kg BB dan kelompok betina 11,87 g/kg BB. Untuk hasil pengujian dengan larva udang (BSLT) memberikan nilai LC₅₀ sebesar 81,28 ppm.

Kata kunci: *Peperomia pellucida* (L.) Kunth, toksisitas akut, BSLT, LD₅₀, LC₅₀.

Abstract: Ketumpangan air (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth), an Indonesian wild plant, is commonly found in every Indonesian region with moist shady place. People usually consume ketumpangan air as a fresh vegetables. Empirically, ketumpangan air is consumed to treat fever, stomach disease, kidney disorders, drug abscesses, boils acne, headaches, pain in arthritic and rheumatic gout, or other external treatment. In this research, we tested the acute toxicity of ethanol extract from ketumpangan air using experimental animals mice DDY strain. We also tested the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) using *Artemia salina* Leach larva shrimp. The main aim of this reseach was to determine the LD₅₀ and LC₅₀ values of ethanol extract from Ketumpangan air. The results showed that the ethanol extract was categorized as 'mild toxic'. The calculation of LD₅₀ with Reed and Munich method showed that the LD₅₀ value for male and female group was 15.13 g/ kg and 11.87 g/kg respectively. The BSLT result showed that the LC₅₀ values of Ketumpangan air was 81.28 ppm.

Keywords: *Peperomia pellucida* (L.) Kunth, acute toxicity, BSLT, LD₅₀, LC₅₀.

PENDAHULUAN

TANAMAN ketumpangan air (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) termasuk dalam famili Piperaceae merupakan tanaman liar yang hidup berkelompok,

tumbuh tersebar di semua daerah di Indonesia yang teduh dan lembab seperti di tepi selokan atau di halaman di bawah tanaman rindang, Tanaman ini memiliki nama daerah yang berbeda; di Jawa disebut seladaan, suruhan, rangu-rangu, di Sumatra disebut ketumpang ayer, di Maluku disebut gotu garoko, di Ternate disebut gofu, goroho, dan di Sulawesi Utara disebut rumput ayam atau pasan ratahan⁽¹⁻³⁾.

* Penulis korespondensi, Hp. 081318212627
e-mail: dewiruslan@yahoo.com

Peperomia pellucida (*P. pellucida*) dapat dikonsumsi sebagai lalapan dan secara empiris digunakan dalam pengobatan demam, penyakit perut, atau pengobatan luar lainnya⁽⁴⁾. Selain itu *P. pellucida* juga digunakan untuk mengobati abses, jerawat, bisul, kolik, kelelahan, asam urat, sakit kepala, gangguan ginjal, rematik, dan nyeri sendi⁽⁵⁾.

P. pellucida mengandung senyawa kimia alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, kalsium oksalat, lemak, dan minyak atsiri polifenol, kardenolid, steroid, triterpenoid, dan karbohidrat^(1, 6, 7). Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman *P. pellucida* mempunyai potensi sebagai antiinflamasi, memiliki efek analgetik, memiliki efek antipiretik, antimikroba, penurun asam urat, antikanker, dan antioksidan⁽⁸⁻¹⁷⁾.

Penelitian yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Kimia terhadap ekstrak *P. pellucida* secara *in vitro* menunjukkan adanya potensi untuk pengobatan infeksi virus dengue. Dengan latar belakang tersebut maka perlu diketahui keamanan ekstrak etanol herba Ketumpangan air dengan metode toksisitas akut menggunakan hewan uji mencit jantan dan betina dan BSLT dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* (*A. salina*) Leach.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Tanaman ketumpangan air (*P. pellucida*) didapat dari kawasan Puspipstek, Serpong, Tangerang Selatan dan dideterminasi di bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong.

Alat. Oven, timbangan analitik, timbangan hewan ayakan mesh 65, *blender*, batang pengaduk, cawan porselen, *evaporator*, mortir dan *stamper*, *hot plate*, *Erlenmeyer*, gelas ukur, aluminium *foil*, *cages* hewan dan perlengkapannya, alat suntik 1 mL, sonde oral tikus, alat bedah, alat skrining farmakologi, dan alat lain yang umum dalam Laboratorium Farmakologi.

METODE. Pembuatan Ekstrak Etanol. Ekstrak etanol dibuat dengan cara maserasi dari 988 gram simplisia kering ketumpangan air menggunakan pelarut etanol 70% 3x 24 jam, dan memekatkan hasil filtrat dengan *vacuum rotary evaporator*, hingga dihasilkan 103 gram ekstrak kental yang telah konstan bobotnya.

Hewan Coba. Hewan coba mencit putih galur DDY berjenis kelamin jantan dan betina sebanyak 100 ekor didapat dari Laboratorium non Ruminansia dan Satwa Harapan, Bagian Produksi Ternak Daging Kerja dan Aneka Ternak Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan IPB usia hewan 2- 3 bulan dan bobot antara 25 - 30 g. Sebelum

digunakan hewan dipelihara terlebih dahulu untuk adaptasi (aklimasi) selama 7-14 hari. Pengamatan dilakukan sebelum dan sesudah pemberian bahan uji, berupa pengamatan terhadap tingkah laku, sistem saraf pusat, urinasi, defekasi, serta kematian hewan sesudah pemberian bahan uji. Autopsi dilakukan terhadap hewan yang telah mati autopsi untuk pemeriksaan organ tubuh secara makroskopik guna mengungkap kerusakan struktur organ paru-paru, lambung, hati, ginjal, jantung, limpa, organ genitalia jantan (testis, vesica seminalis), dan organ genitalia betina (uterus, ovarium).

Penentuan Dosis Letal 50% (LD₅₀). Dosis letal 50% merupakan nilai kumulatif dari hasil uji toksisitas akut yang dilakukan dengan metode resmi yang ditetapkan oleh Pusat Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI⁽¹⁸⁾. Mencit galur DDY jantan dan betina masing-masing 50 ekor, dibagi secara acak menjadi 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor, diberi perlakuan dosis oral tunggal 2250; 4500, 9000 dan 18000 mg/kg BB ekstrak etanol ketumpangan air. Semua diberikan dengan volume 1 mL per rata rata bobot badan. Sebelum dan sesudah diberikan bahan uji, mencit diamati perilakunya. Efek yang diamati meliputi rasa ingin tahu, aktivitas motorik, fenomena *straub*, piloereksi, ptosis, refleks pineal, refleks kornea, lakrimasi, midriasis, katalepsi, sikap tubuh, menggelayut, retablismen, fleksi, *Hafner*, *grooming*, urinasi, defekasi, dan mortalitas (terjadinya kematian pada setiap hari selama 14 hari). Mencit yang mati segera dibedah untuk mengamati penyebab kematian. Data kematian hewan uji diolah untuk menentukan nilai LD₅₀ oral yang dihitung dengan metode *Reed Muench*⁽¹⁹⁾. Bobot badan mencit yang bertahan hidup diamati setiap hari sampai hari ke-14. Data dibuat grafik perubahan rata-rata bobot untuk melihat pengaruh bahan uji terhadap perkembangan bobot badan.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Larva udang didapat dengan menetas telur *A. salina* yang diinkubasi dalam air laut selama 48 jam. Sebanyak 10 larva dimasukkan ke dalam *microplate* kemudian ditambahkan ekstrak yang dilarutkan dalam air laut dengan konsentrasi 25, 50, 100, 250, 500 dan 1000 ppm, diinkubasi 24 jam, di bawah cahaya lampu neon 18 watt. Sebagai kontrol, digunakan 10 ekor larva *A. salina* Leach di dalam 200 µL air laut tanpa diberi ekstrak.

Nilai LC₅₀ adalah adalah konsentrasi senyawa atau ekstrak yang dapat mematikan larva udang *Artemia salina* Leach hingga 50% dibandingkan terhadap kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan pelarut etanol 70% dalam pengumpulan ekstrak agar semua senyawa kimia dari yang kurang polar sampai polar dalam sampel dapat terambil semaksimal mungkin, selain itu pelarut etanol relatif lebih aman dan biasa untuk sediaan fitofarmaka. Pada umumnya etanol dapat mengekstraksi senyawa-senyawa dari golongan alkaloid, sterol, saponin, flavonoid antrakuinon dan glikosida dari tumbuhan.

Hewan coba yang umum digunakan untuk uji toksisitas akut adalah tikus putih dan mencit^(20,21). Namun demikian penggunaan hewan coba mencit untuk toksisitas akut dinilai lebih baik karena LD₅₀ manusia lebih dapat diprediksi dari data LD₅₀ mencit⁽²²⁾. Oleh karena itu penelitian ini menggunakan hewan coba mencit untuk uji toksisitas akut.

Jumlah kematian kumulatif mencit jantan dan betina dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Semua kematian mencit mulai terjadi pada hari ke-3 setelah mencit diberikan ekstrak *P. pellucida*. Pada mencit betina kematian terjadi pada dosis 9000 mg/kg BB dan pada mencit jantan kematian terjadi pada dosis 18000 mg/kg BB. Kematian pada mencit betina lebih banyak dari mencit jantan. Perbedaan ketoksikan dapat

terjadi karena hewan betina dengan hewan jantan mempunyai sistem hormonal yang berbeda. Hormon yang diproduksi oleh kelenjar endokrin mempengaruhi secara langsung perbedaan dari ketoksikan⁽²³⁾.

Sesuai dengan metode *Reed Muench* yang menganut asumsi bahwa bilamana suatu dosis yang diberikan menyebabkan kematian maka semua tingkat dosis di atas dosis tersebut akan menyebabkan kematian, dan sebaliknya bilamana suatu dosis tidak memberikan kematian maka semua tingkat dosis dibawah dosis tersebut tidak akan menyebabkan kematian. Pada uji ini didapatkan nilai LD₅₀ kelompok jantan sebesar 15,13 g/kg BB dan kelompok betina 11,87 g/kg BB. Untuk hal tersebut ekstrak ethanol *P. pellucida* dikategorikan toksik ringan⁽²⁰⁾.

Pengamatan klinis menunjukkan bahwa pada kelompok dengan pemberian dosis tinggi terjadi gejala toksik dimana hewan mati didahului dengan kejang-kejang dan penurunan konsumsi pakan. Pengamatan dan pengukuran bobot juga dilakukan pada organ-organ tubuh penting. Untuk mencit betina organ yang diamati meliputi hati, jantung, pankreas, limpa, ginjal, lambung, uterus, ovarium, dan paru-paru. Sedangkan jantan meliputi jantung, paru, hati, pankreas, limpa, lambung, ginjal, testis, dan vesika seminalis. Dari data

Tabel 1. Jumlah kematian kumulatif mencit jantan setelah pemberian dosis tunggal ekstrak etanol ketumpangan air.

	Hari ke-													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 2,25 g/kg BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 4,5g/kg BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 9 g/kg BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 18g/kg BB	0	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Tabel 2. Jumlah kematian kumulatif mencit betina setelah pemberian dosis tunggal ekstrak etanol ketumpangan air.

	Hari ke-													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 2,25 g/kg BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 4,5g/kg BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis 9 g/kg BB	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Dosis 18g/kg BB	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

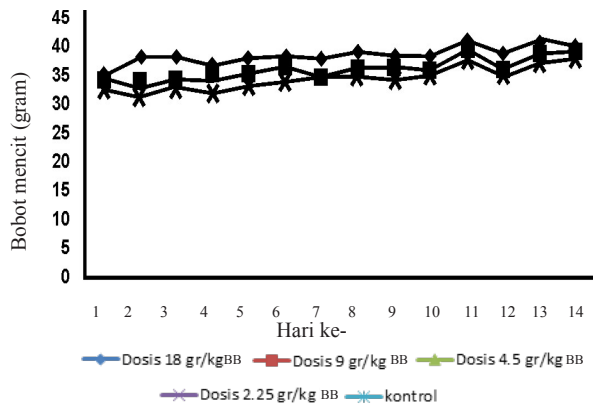
Tabel 3. Berat organ mencit jantan pada uji toksisitas akut ekstrak etanol ketumpangan air.

Organ	Dosis (g/kg BB)				Kontrol
	18	9	4,5	2,25	
Jantung	234,6	215,3±33,8	198,9±37,6	198,7±46,4	214,3±54,9
Paru-paru	233,1	282,4±27,4	273,6±47,2	257,9±47,0	308,3±49,3
Hati	2167,5	2173,4±187,6	2204,1±204,2	2295,4±361,5	2297,6±415,3
Limpa	158,7	185,4±30,7	173,3±37,9	156,9±50,5	181,9±49,9
Lambung	294,5	387,3±70,3	352,5±30,0	351,6±51,2	499,1±42,7
Pankreas	219,1	220,6±60,3	197,7±27,4	185,7±39,9	199,3±36,9
Ginjal	697	557±62,0	629,6±50,1	552,8±77,9	606±86,9
Testes	318,1	263,1±29,0	261,7±35,8	287,9±32,2	307,3±68,4
Vesikal seminalis	202,8	173,3±37,9	207±47,2	162±55,6	210,3±65,7

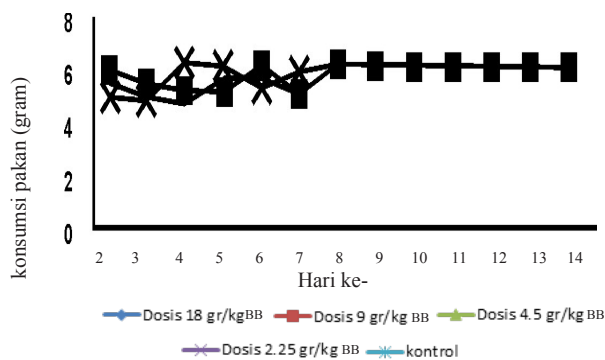
Tabel 4. Berat organ mencit betina pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.

Organ	Dosis (g/kg BB)				Kontrol
	18*	9	4,5	2,25	
Jantung	-	185,3±20,4	202,4±33,6	179,4±22,5	173,9±23,6
Paru-paru	-	346±54,2	29,8±48,6	272,2±50,1	287,0±39,1
Hati	-	2087,5±364,8	2330,0±297,7	1937,4±195,3	2048,8±276,4
Limpa	-	180,4±40,8	173,5±21,2	163,5±32,9	163,5±27,3
Lambung	-	336,1±106,1	413,9±87,9	329,3±56,7	407,2±34,4
Pankreaas	-	277,8±15,1	160,9±25,1	186,2±32,9	167,9±58,8
Ginjal	-	523,3±84,5	474,4±35,1	445,8±17	439,6±58,6
Uterus	-	138,1±77,6	86,6±52,3	102,4±39,4	112,8±40,4
Ovarium	-	45,1±12,9	21,8±6,6	48,4±27,9	85,7±10,1

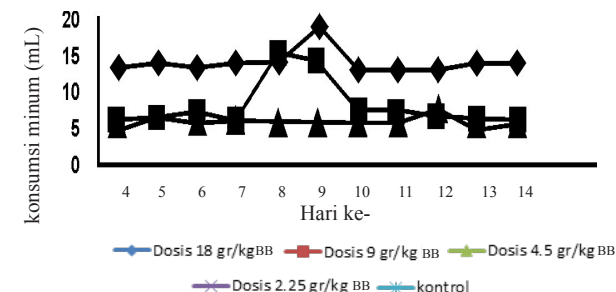
Keterangan: *pada dosis 18 g/kg BB semua mencit mati.



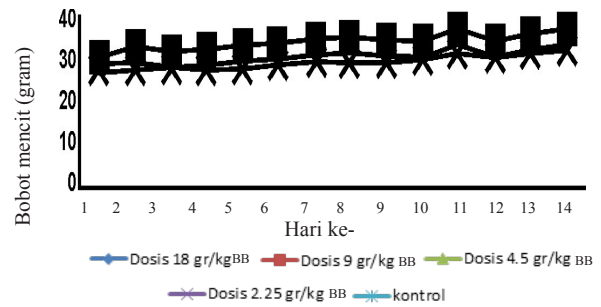
Gambar 1. Bobot badan mencit jantan pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air



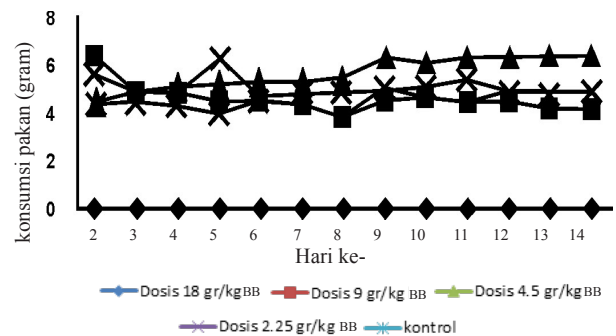
Gambar 2. Konsumsi pakan mencit jantan pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.



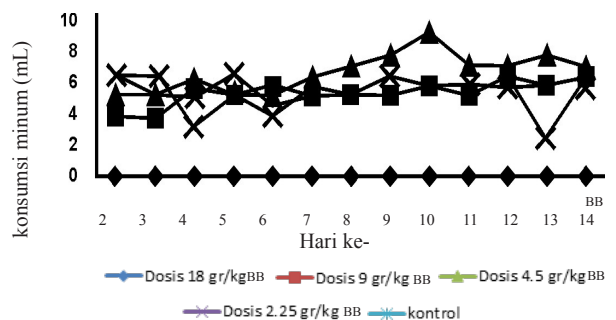
Gambar 3. Konsumsi minum mencit jantan pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.



Gambar 4. Bobot badan mencit betina pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.



Gambar 5. Konsumsi pakan mencit betina pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.



Gambar 6. Konsumsi minum mencit betina pada uji toksistas akut ekstrak etanol ketumpangan air.

berat masing-masing organ yang diperoleh, kemudian diolah secara statistik dengan menggunakan *one-way anova*. Untuk pengamatan organ mencit jantan dan betina dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4. Grafik berat

badan konsumsi pakan dan minum mencit jantan saat pengujian terlihat pada Gambar 1, 2 dan 3, sedangkan untuk mencit betina terlihat pada Gambar 4,5 dan 6.

Pengukuran nilai LC_{50} dengan BSLT dapat dikatakan aktif atau toksik seperti terlihat pada Tabel 5 adalah 81,28 ppm. Suatu zat dapat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm untuk ekstrak dan ≤ 30 ppm untuk suatu senyawa.

Tabel 5. Pengukuran nilai LC₅₀ dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

	Konsentrasi (ppm)					
	25	50	100	250	500	1000
Log K	1,4	1,7	2,0	2,4	2,7	3,0
Hidup awal	10	11	11	10	11	11
	11	10	10	10	11	10
Hidup akhir	10	9	9	8	6	4
	10	9	9	8	7	4
	11	8	8	7	5	2
Mati	1	5	5	8	15	22
Hidup	31	26	26	23	18	10
Akumulasi mati	1	6	11	19	34	56
Akumulasi hidup	134	103	77	51	28	10
Mortalitas	0,74	5,51	12,50	27,14	54,84	84,85
LC ₅₀	81,28					

SIMPULAN

Hasil uji toksisitas ekstrak etanol ketumpangan air (*P. pellucida*) dikategorikan toksik ringan dan terdapat pengaruh nilai LD₅₀ pada perbedaan jenis kelamin yaitu kelompok jantan sebesar 15,13 g/kg BB dan kelompok betina 11,87 g/kg BB. Hasil uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan LC₅₀ adalah 81,28 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada sub program: *Molecular Farming* dan Bahan Baku Obat proyek kompetitif LIPI tahun 2013 yang telah memberikan dana untuk penelitian ini. Ucapan yang sama juga kami tujukan kepada rekan Tri Yuliani dan Lili Hermawan yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Djauhariya E, Hernani. *Gulma berkhasiat obat*. Jakarta: Penebar Swadaya; 2004.
- Dalimartha S. *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Jilid 4. Jakarta: Puspa Swara; 2006
- Kinho J, Arini DID, Tabba S, Kama H, Kafiar Y, Sabri S, Karundeng MC. *Tumbuhan obat tradisional di Sulawesi Utara*. Vol I. Manado: Balai Penelitian Kehutanan; 2011. 69.
- Heyne K. *Tumbuhan berguna Indonesia*. Jilid III. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya; 1987.
- Pulak M, Priya A, Satya V. Ethno-medicinal, phytochemical and pharmacological review of an amazing medicinal herb *Peperomia pellucida* (L.) HBK. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*. 2011.2(4):358-64.
- Egwuche RU, Odetola AA, and Erukainure OL. *Res J Phytochem*. 2011.5:48-53.
- Tiara M, Jaya EH, Novel K. Formulasi gel ekstrak daun sasaladahan (*Peperomia pellucida* (L.) H.B.K) dan uji efektivitasnya terhadap luka bakar pada kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*). *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT*. 2013.2(2):49-55.
- De Fátima Arrigoni BM, Dmitrieva EG, Franzotti EM, Antonioli AR, Andrade MR, Marchioro M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004.91:215–8.
- Wijaya S, Monica SW. Uji efek antiinflamasi ekstrak herba Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) pada tikus putih jantan. *Berk. Penel. Hayati*. 2004.9(1): 115-8.
- Aziba PI, Adedeji A, Ekor M, Adeyemi O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. *Fitoterapia*. 2001.72:57-8.
- Mulyani D. Uji efek analgetik herba Suruhan (*Peperomia pellucida*) pada mencit putih betina. *Scientia*. 2011.1(2):34-8.
- Khan A, Rahman M, Islam S. Antipyretic activity of *Peperomia pellucida* leaves in rabbit. *Turk J Biol*. 2008.32:37-41.
- Seong WL, Wee W, Siong JYF, Syamsumir DF. Characterization of anticancer, antimicrobial, antioxidant properties, and chemical compositions of *Peperomia pellucida* Leaf extract. *Acta Medica Iranica*. 2011. 49(10):670-4.
- Mariani TI, Bahri S, Saragih A. Aktivitas antihiperurisemia ekstrak etanol herba Suruhan (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) pada mencit jantan. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*. 2012.1(1):37-43.
- Nanang Y. Efek ekstrak air dan heksan herba Suruhan (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) terhadap penurunan kadar asam urat serum darah ayam kampung jantan. *Media Litbangkes*. 2013.23(1):8-14.
- Oloyede GK, Onocha PA, Olaniran BB. Phytochemical, toxicity, antimicrobial, and antioxidant screening of leaf extracts of *Peperomia pellucida* from Nigeria *Advances in Environmental Biology*. 2011.5(12):3700-9.
- Widowati W, Wijaya L, Wargasetia TL, Bachtiar I, Yellianty, Laksmiawati DR. Antioxidant, anticancer, and apoptosis-inducing effects of Piper extracts in HeLa cells. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2013.3(3):225-30.
- Siregar CJP. *Prosedur operasional baku uji toksisitas*, Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan – WHO Collaborator Centre for quality assurance of Essential Drugs. Jakarta: Departemen Kesehatan; 1981.
- Miya TS, et al. *Laboratory guide in pharmacology*. 3rd Ed. Minneapolis: Burgers Publishing Co; 1968.
- Lu FC. *Toksikologi dasar: Asas, organ, sasaran, dan penilaian resiko*. Edisi 2. Jakarta: UI Press; 1995.
- Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. *Pedoman pelaksanaan uji klinik obat tradisional*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2000. 1-22.

22. Walum E. Acute oral toxicity. *Environmental Health Perspective*. 1998.106(S2):497-503.
23. Lazarovici P, Laberbourn-Galski H. *Chimeric toxin: Mechanisms of actions and therapeutic applications*. New York: CRC Press; 2002.
24. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982.45(5):31-4.