

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI AUSTRALIA
(*Psidium guajava* L) DENGAN METODE BSLT
(*Brine Shrimp Lethality Test*)**

Nofita¹, Ade Maria Ulfa², Miera Delima³

¹ Program Studi Farmasi Universitas Malahayati Bandar Lampung

² Program Studi Farmasi Universitas Malahayati Bandar Lampung

Email: nofita82apt@gmail.com

HP: 082186751140

ABSTRACT

Guava is one of the plants that can traditionally be used for the treatment of diseases. Many kinds of guava, one of which is the Australian guava has the characteristics of roots, stems, leaves, dark red fruit. This study aims to determine the toxicity of the ethanol extract of Australian guava leaves (*Psidium guajava* L) using the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) method and determine the chemical content of Australian guava leaves (*Psidium guajava* L). The extract was made by the ultrasonic method using 96% ethanol solvent. Toxicity tests were carried out using 48-hour-old *Artemia salina* Leach shrimp larvae. The toxic effect of the extract was identified by the percentage of shrimp larvae mortality using probit analysis (LC₅₀). From the research results, phytochemical content includes tannins, flavonoids, alkaloids, terpenoids and saponins, and flavonoid compounds have the highest content compared to the others. Research shows that the ethanol extract of Australian guava leaves is of a moderate category (LC₅₀ 441,977 ppm).

Keywords :Australia guava leaves, BSLT, *Artemia salina* L, Ultrasonic

ABSTRAK

Jambu biji merupakan salah satu tanaman yang secara tradisional dapat dimanfaatkan untuk pengobatan penyakit. Banyak macam jambu biji salah satunya jambu biji Australia yang memiliki ciri akar, batang, daun, buah berwarna merah tua. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas dari ekstrak etanol daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L) menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan menentukan kandungan kimia dari daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L). Ekstrak dibuat dengan metode ultrasonik menggunakan pelarut etanol 96%. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Efek toksik ekstrak diidentifikasi dengan persentase kematian larva udang menggunakan analisis probit (LC₅₀). Dari hasil penelitian, kandungan fitokimia meliputi tanin, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan saponin, dan senyawa flavonoid memiliki kandungan yang paling tinggi dibandingkan yang lain. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu biji Australia bersifat toksik kategori sedang (LC₅₀ 441,977 ppm).

Kata kunci : daun jambu biji Australia, BSLT, *Artemia salina* L, ultrasonik

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan, salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat yaitu tanaman jambu biji. Di Indonesia terdapat beberapa macam jambu biji, salah satunya yaitu jambu biji Australia (*Psidium guajava* L). Tanaman yang berasal dari Australia ini memiliki ciri-ciri yang khas yaitu akar, batang, daun dan buah berwarna merah tua (Parimin, 2005). Daun jambu biji mengandung golongan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, tannin, terpenoid (Dwitiyanti, 2015).

Senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh dengan cara ekstraksi, salah satu metode yang digunakan yaitu metode ekstraksi ultrasonik. Kelebihan metode ultrasonik yaitu kecepatan ekstraksinya dibanding dengan ekstraksi termal atau konvensional, lebih aman, lebih singkat dan dapat meningkatkan jumlah rendemen kasar (Handayani *et al.*, 2016) sehingga memungkinkan didapat metabolit sekunder yang lebih banyak.

Uji toksisitas bertujuan untuk mengetahui efek toksik yang terkandung dalam bahan alam. Belakangan ini pengujian tentang toksisitas dikembangkan untuk pencarian produk alam yang berpotensi sebagai bahan antineoplastik. Salah satu metode skrining yang digunakan untuk menentukan ketoksikan suatu senyawa yaitu metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pengujian efek toksik ini menggunakan larva udang *Artemia salina*. Kematian larva udang *Artemia salina* digunakan sebagai parameter untuk menunjukkan adanya kandungan zat aktif tanaman yang bersifat sitotoksik jika harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ (Meyer *et al.*, 1982).

Berdasarkan pada uraian diatas, maka perlu dilakukan pengujian pada ekstrak daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L) dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk menguji apakah

mempunyai efek toksik pada larva udang (*Artemia salina* L).

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis, *Ultrasonik bath*, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, *blender*, oven, kuvet, bak penetas larva udang, lampu TL 14 watt, *vacum rotary evaporator*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu etanol, telur artemia, air laut, aquadest, telur *A. salina* L, AlCl_3 , Na_2CO_3 , pereaksi *folin*, kuersetin, asam tanat, kafein, tween 80.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji Australia

Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah metode ultrasonik dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia daun jambu biji Australia ditimbang sebanyak 600 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 6 L (1:10) kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan alat ultrasonikator dengan suhu 45 °C selama 20 menit, hasil ekstraksi kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat *vacum rotary evaporator*.

Uji Skrining Fitokimia

1. Identifikasi Terpenoid

Sebanyak 2 mL sampel ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid.

2. Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 mL aquades, disaring lalu filtratnya ditambahkan reagen besi (III) klorida (FeCl_3) 1% 5 mL. Warna biru tua atau hitam menunjukkan adanya tannin.

3. Identifikasi Alkaloid

Dilarutkan 50 mg ekstrak dengan beberapa mL HCl kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff dalam tabung reaksi yang berbeda. Reaksi positif ditandai dengan adanya endapan putih atau kekuningan pada pereaksi Mayer, munculnya warna merah-kehitaman pada pereaksi Wagner, dan terbentuk endapan orange pada pereaksi Dragendorff.

4. Identifikasi Flavonoid

0,1 gram ekstrak ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg, lalu ditambahkan 5 mL HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, jingga atau merah.

5. Identifikasi Saponin

Menambahkan sebanyak 0,5 mL sampel ke dalam 5 mL aquades, kemudian dihomogenkan selama 30 detik, jika terdapat buih atau busa manunjukkan positif saponin.

Penetapan Kadar Dengan Spektrofotometri

UV-Vis

1. Penetapan Kadar Tanin

a. Pembuatan Larutan Standar Asam Tanat 1000 ppm

Ditimbang 0,1 gram asam tanat kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades.

b. Pembuatan Kurva Baku

Dari larutan standar asam tanat 1000 ppm dibuat seri pengenceran yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm. Dari masing-masing seri pengenceran dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam wadah labu tentukur 10 mL yang telah berisi 7,5 ml

aquades. Kemudian ditambahkan 0,5 ml pereaksi *folin denis*, didiamkan 3 menit lalu ditambahkan larutan Na_2CO_3 jenuh sebanyak 1 mL, diinkubasi selama 15 menit. Pembuatan kurva baku dilakukan pada panjang gelombang 720 nm.

2. Penetapan Kadar sampel

Ditimbang 50 mg ekstrak dilarutkan dengan aquades sampai 10 mL. Kemudian dipipet 1,0 mL sampel, dimasukkan ke dalam wadah berukuran 10 mL yang sudah berisi 7,5 mL aquades, lalu ditambahkan pereaksi *folin denis* sebanyak 0,5 mL, didiamkan 3 menit, ditambahkan 1,0 mL larutan Na_2CO_3 jenuh. Kemudian diinkubasi selama 15 menit, dibaca serapannya pada panjang gelombang 720 nm.

2. Penetapan Kadar Flavonoid

a. Pembuatan Larutan Standar Kuarsetin

Ditimbang baku standar kuarsetin sebanyak 25 mg dan dilarutkan dalam 25 mL etanol. Larutan stok dibuat konsentrasi 100 ppm dengan cara dipipet 1 mL larutan stock dan tambahkan etanol 10 mL. Dari konsentrasi kuarsetin 100 ppm, kemudian dibuat beberapa konsentrasi yaitu 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuarsetin ditambahkan 1 mL AlCl_3 10 % dan 1 mL kalium asetat 120 mM. Sampel diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 430 nm.

b. Penetapan Kadar sampel

Lakukan penimbangan 15 mg ekstrak, dilarutkan dalam 10 mL etanol, sehingga diperoleh konsentrasi 1500 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 1 mL tambahkan 10 mL etanol. Setelah itu pipet 1 mL larutan sampel tambahkan 1 mL AlCl_3 10 % dan 1 mL kalium asetat 120 mM. Sampel diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 430 nm.

3. Penetapan Kadar Alkaloid

a. Pembuatan Larutan Standar Kafein

Pembuatan larutan baku dibuat dengan menimbang kafein 25 mg dilarutkan dengan aquadest 25 mL. dari konsentrasi 1000 ppm dibuat 100 ppm yaitu dengan mengambil 2,5 mL dalam 25 mL aquadest. Kemudian dibuat konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm diukur pada panjang gelombang 274 nm.

b. Penentuan Kadar sampel

Penetapan kadar alkaloid dilakukan dengan cara sampel sebanyak 25 mg dalam 25 mL aquadest. Kemudian dipipet 1 mL dilarutkan dalam 10 mL aquadest dan disaring. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 273 nm.

Uji Toksisitas Menggunakan Larva Udang (*A.salina* L) Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Uji toksisitas dilakukan berdasarkan metode McLaughlin et al., (1998) yang sudah dimodifikasi.

1. Penyiapan larva udang *A.salina* L

Dilakukan dengan merendam sebanyak 10 mg telur *A. salina* L dalam 1 L air laut yang telah disaring untuk penetasan, diberi penerangan dengan sinar lampu TL 14 watt serta diaerasi selama 24 jam pada suhu kamar. Larva udang yang digunakan untuk uji toksisitas yang telah berumur 48 jam.

2. Penyiapan larutan stok

Sebanyak 20 mg ekstrak ditempatkan pada labu takar 10 mL, kemudian ditambahkan air

laut untuk melarutkan ekstrak, jika tidak larut maka ditambahkan tween 80 beberapa tetes. Setelah homogen lalu dicukupkan dengan air laut sampai volume mencapai 10 mL, digunakan sebagai larutan stok 2000 ppm dan dibuat pengenceran 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm dan 0 ppm sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak.

3. Uji toksisitas

Pengujian dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva udang ke dalam masing-masing wadah pengujian (mikroplat) dan ditambah ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, volume setiap wadah pengujian dicukupkan hingga 2 mL dengan penambahan air laut. Setiap konsentrasi ekstrak diuji sebanyak 4 kali pengulangan. Kemudian diinkubasi dilakukan pada suhu kamar dibawah sinar lampu TL 14 watt selama 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap jumlah larva yang mati. Kontrol dilakukan dengan prosedur yang sama tanpa penambahan ekstrak.

Analisis Data

Menggunakan Analisis Probit

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva awal}} \times 100\%$$

Toksisitas dihitung sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

a= intercept

b= slop

$$y = \text{nilai probit } y = 5,00 \text{ (kematian 50\%)}$$

x = konsentrasi ekstrak lalu di antilog

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Ekstraksi

Sampel	Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Susut pengeringan (%)	% Rendemen
Daun jambu biji Australia	1.370	600	43,79	30,67

Dari proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ultrasonik, diperoleh % rendemen 30,67%. Rendemen merupakan kadar kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan yang dinyatakan dalam %.

Penentuan rendemen berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut namun tidak dapat menentukan jenis senyawa yang terbawa oleh pelarut (Ahmad, 2016).

2. Uji Skrining fitokimia

Golongan senyawa yang diuji	Hasil pengamatan	keterangan
Terpenoid	Terbentuk warna ungu	+
Tanin	Terbentuk warna hitam	+
Alkaloid	Mayer : terbentuk endapan kekuningan Wagner : terbentuk warna merah kehitaman Dragendroff : terbentuk endapan orange	+
Flavonoid	Terbentuk warna jingga	+
Saponin	Terbentuk busa	+

Keterangan + : positif mengandung senyawa yang diuji

Dari hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji Australia mengandung senyawa golongan terpenoid, tanin, alkaloid, flavonoid dan saponin. Untuk uji fitokimia terpenoid ekstrak ditambah reagen Liebermann-Burchard yaitu campuran antara HCl pekat dengan H₂SO₄ pekat. Analisis ini didasarkan pada kemampuan senyawa terpenoid membentuk warna oleh H₂SO₄ pekat dalam pelarut asam klorida. Hasilnya pada uji fitokimia sampel mengandung terpenoid yang membentuk warna ungu.

Uji senyawa tanin menggunakan reagen FeCl₃ 1% untuk mengidentifikasi gugus fenol. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak setelah ditambah dengan FeCl₃ karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe³⁺.

Uji fitokimia alkaloid dilakukan penambahan HCl sebelum ditambah pereaksi karena alkaloid bersifat basa sehingga diekstrak dengan pelarut asam (Harborne, 1996). Pada uji Mayer, terbentuk endapan kekuningan. Uji

wagner memberikan hasil warna merah kehitaman. Pereaksi dragendroff membentuk endapan orange. Prinsip dari metode analisis ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi.

Pada uji fitokimia flavonoid, ekstrak ditambahkan serbuk Mg lalu ditambahkan HCl pekat, terbentuk warna jingga. Uji ini menggunakan magnesium sebagai pereduksi dimana reduksi tersebut

dilakukan dalam suasana asam dengan penambahan HCl. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu.

Uji fitokimia saponin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya busa setelah pengocokan dan stabil setelah didiamkan selama 10 menit. Timbulnya busa ini menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990).

3. Penetapan Kadar Dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Senyawa	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)	(%) Kadar
Tanin	6,68	6,82	3,41
	6,38		
	7,40		
Flavonoid	6,13	6,15	4,10
	6,16		
	6,16		
Alkaloid	3,77	4,07	4,07
	4,38		
	4,07		

Dari hasil penetapan kadar tanin, flavonoid dan alkaloid menggunakan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa kadar flavonoid menunjukkan kadar yang paling tinggi. Pada penelitian kandungan tanin ditentukan berdasarkan penambahan reagen pembentuk warna yaitu folin denis. Pembentukan warna yang terjadi berdasarkan reaksi reduksi oksidasi. Tanin sebagai reduktor dan folin denis sebagai oksidator. Prinsip reagen folin denis yaitu terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru sehingga dapat diukur serapannya pada daerah sinar tampak. Ekstrak etanol daun jambu biji Australia diukur serapannya dan dihitung kadar tanin diperoleh hasil 3,41%.

Pada penetapan kadar flavonoid, larutan sampel ditambahkan $AlCl_3$ yang dapat

membentuk kompleks sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak). Ditandai dengan larutan yang menghasilkan warna lebih kuning. Penambahan kalium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah tampak (Chang *et al*, 2002). Ekstrak etanol daun jambu biji Australia diukur serapannya dan dihitung kadar flavonoid diperoleh hasil 4,10%.

Pada penetapan kadar alkaloid, pengukuran absorbansi alkaloid untuk menentukan kurva kalibrasi kafein dengan panjang gelombang maksimal yang diperoleh yaitu 274 nm. Ekstrak etanol daun jambu biji Australia diukur serapannya dan dihitung kadar alkaloid diperoleh hasil 4,07%.

4. Uji Toksisitas Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Konsentrasi ekstrak (mg/L)	Persentase kematian (%)	Nilai LC ₅₀ (mg/L)	Keterangan
12,5	2,5		
25	10		
50	17,5	441,977	Toksik sedang
100	25		
500	42,5		
1000	70		

Dari hasil Pengujian toksisitas dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) diperoleh hasil 441,977 mg/L yang tergolong toksisitas sedang. Menurut Hamidi (2014) rentang kategori toksik sedang yaitu 100-500 mg/L. Jika nilai LC₅₀ ekstrak atau senyawa yang diuji <1000 mg/L maka dianggap menunjukkan adanya aktivitas biologik, sehingga pengujian ini dapat digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa bioaktif yang diduga berkhasiat sebagai antikanker (Meyer *et al.*, 1982). Dari hasil analisa penelitian menunjukkan pula bahwa pada kontrol tidak ada larva udang yang mati, kematian larva hanya disebabkan oleh pengaruh ekstrak yang ditambahkan.

Golongan senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas akut serta dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* L (Cahyadi, 2009). Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa tersebut dalam daun jambu biji Australia yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut bertindak sebagai racun perut atau *stomach poisoning* sehingga akan mengganggu alat pencernaannya. Selain itu reseptor perasa pada daerah mulut larva juga akan dihambat sehingga menyebabkan gagalnya stimulus rasa pada larva sehingga tidak mampu mengenali makanannya. Hal ini mengakibatkan larva mengalami kelaparan dan akhirnya mati.

Tanin merupakan senyawa polifenol, pada konsentrasi tinggi bertindak sebagai toksin bagi plasma untuk merusak dinding sel dan mengumpulkan protein sel, sedangkan pada konsentrasi rendah dapat menghambat multifikasi enzim *in vitro* (Ogata *et al.*, 2005 dalam Herawati *et al.*, 2009). Senyawa-senyawa tersebut dapat bersinergi berperan sebagai toksin sehingga nilai toksisitas ekstrak yang mengandung banyak senyawa tersebut menjadi toksik

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian uji toksisitas ekstrak etanol daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L) dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dapat disimpulkan :

1. Ekstrak etanol daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L) memiliki efek toksik terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) toksisitas sedang.
2. Nilai LC₅₀ ekstrak etanol daun jambu biji Australia (*Psidium guajava* L) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) sebesar 441,977 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad AR, Juwita J, Ratulangi SAD, Malik A. 2016. Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patilaka (*Etilingera elatior* (jack) Rm Sm) Menggunakan Spektrofotometri

- UV-Vis. *Pharmaceutical Sciences And Research (Psr)*, 2(1), Pp 1-10.
- Cahyadi R. 2009. Uji Toksisitas Aku Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordika charantia* L) Terhadap Larva *Artemia salina* L Dengan Metode BSLT [Skripsi]. Semarang: UNDIP.
- Chang C, Yang M, Wen Hand Chern J. 2002. Estimation of the Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.*
- Dwitiyanti. 2015. Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) sebagai Antikanker Payudara. [Skripsi]. Jakarta Timur: UM Prof. DR. Hamka.
- Handayani H, Sriherfyna FH. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun
- Parimin SP. 2005. *Jambu Biji: Budidaya dan Ragam Pemanfaatannya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rusdi. 1990. Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat. Padang : Pusat Penelitian Universitas Andalas
- Sirsak Metode Ultrasonik Bath (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 4(1) : 262-272.
- Harborne JB. 1897. Metode Fitokimia. "Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan" Terbitan kedua. Bandung: ITB.
- Herawati N, Jalaluddin N, Daha L, Firdaus Z. 2009. *Sonneratia alba* sebagai sumber senyawa antibakteri potensial. *Jurnal Indonesia Chemica Acta*. 2(2): 10-16.
- McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. 1998. The Use Of Biological Assays To Evaluate Botanicals. *Drug Inform JL*. Vol 32.
- Meyer BN. 1982. Brine Shimpe, A: "Convenient General Bioassay for active Plant Constituent". *Plant Medica*.