**Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kale Keriting (*Brassica oleracea* *var*. *sabellica* L*.)* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Zhafira Putri Andrini, Sri Peni Fitrianingsih, Siti Hazar

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

zhafiraputrii38@gmail.com, spfitrianingsih@gmail.com, sitihazar1009@gmail.com

**Abstract.** Cytotoxic agent is a compound or substance that can damage the normal cell or the cancer cell. Cytotoxic activity can be tested using a preleminary test with Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) on Artemia franciscana Kellogg larvae by using plants that contain secondary metabolites with an anticancer activity. In this study, curly kale leaf (Brassica oleracea var. sabellica. L.) which contain flavonoids that has an anticancer activity were used. This study aimed to determine the cytotoxic effect of curly kale leaf (*Brassica oleracea var. sabellica.* L*.*) extract and fractions that obtained from LC50 value. The test was carried out using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) on 48-hour-old shrimp *Artemia franciscana* Kellogg larvae. The concentrations of the test sample used were 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm and the negative control group was DMSO. Observations were made for 24 hours on the larva’s deaths. The LC50 value was obtained using the probit analysis of mortality percentage. The ethanolic extract and fractions of curly kale leaf (*Brassica oleracea var. sabellica* L.) have a cytotoxic effect to the *Artemia franciscana* Kellogg larvae with LC50 value of ethanolic extract is 226,9342 ppm, water fraction 695,8249 ppm, ethyl acetate fraction 52,9053 ppm, and n-hexane fraction 45,5826 ppm.

Keywords: *Brassica oleracea var. sabellica. L., Cytotoxic test, Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), LC50.*

**Abstrak.** Agen sitotoksik merupakan suatu senyawa atau zat yang dapat merusak sel normal atau sel kanker. Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dapat dilakukan dengan uji pendahuluan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap larva udang *Artemia franciscana* Kellogg dengan menggunakan tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antikanker. Pada penelitian ini digunakan daun kale keriting (*Brassica oleracea* *var. sabellica.* L.) yang diduga mengandung senyawa antikanker yaitu flavonoid. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol dan fraksi daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica.* L*.*) yang didapatkan dari nilai LC50. Pengujian dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang (*Artemia franciscana* Kellogg) yang berumur 48 jam. Konsentrasi sampel uji yang yang digunakan 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm dan kontrol negatif menggunakan DMSO. Pengamatan dilakukan selama 24 jam pada kematian larva. Nilai LC50 diolah menggunakan analisis probit dari persentase mortalitas. Daun kale keriting (*Brassica oleracea* *var. sabellica.* L.) memiliki aktivitas sitotoksik karena berada dalam kategori toksik terhadap larva *Artemia franciscana* Kellogg*,* dengan nilai LC50 pada ekstrak etanol 226,9342 ppm, fraksi air 695,8249 ppm, fraksi etil asetat 52,9053 ppm, dan fraksi n-heksan 45,5826 ppm.

Kata Kunci: *Brassica oleracea var. sabellica. L., Uji Sitotoksik, Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), LC50.*

1. Pendahuluan

Penyakit kanker di Indonesia masih menjadi permasalahan kesehatan yang ditunjukkan dari adanya peningkatan kasus baru dalam beberapa tahun terakhir. Dari data Riskesdas, pada tahun 2013 hingga tahun 2018 terjadi peningkatan terhadap prevalensi penyakit kanker dari 1,4% menjadi 1,49% [11]. Kanker adalah penyakit yang disebabkan karena adanya pertumbuhan sel abnormal yang tumbuh dengan berproliferasi dan biasanya menyerang jaringan tubuh terdekat hingga menyebar ke jaringan lain hingga organ-organ tubuh [19].

Pengobatan antikanker dapat dilakukan dengan pembedahan, radiasi, dan kemoterapi [11]. Namun, pengobatan tersebut memiliki efek samping yang cukup tinggi dan tidak selektif, misalnya obat-obatan kemoterapi yang tidak hanya menyerang sel kanker, namun juga dengan sel-sel normal tubuh yang dapat berproliferasi secara cepat yaitu rambut, sumsum tulang belakang, dan sel pada saluran pencernaan [13]. Sehingga dilakukan upaya pengobatan alternatif untuk menghindari efek samping tersebut.

Salah satu tanaman yang diduga mengandung senyawa antikanker adalah Kale (*Brassica oleracea var. sabellica.* L*.*), tanaman kale termasuk kedalam famili Brassicaceae [8]. Tanaman dengan famili Brassicaceae memiliki kandungan yang bervariasi tergantung pada varietas dan kondisi lingkungan tanamnya. Tanaman kale keriting mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antikanker yaitu flavonoid (kuersetin dan kaempferol) [6].

Agen sitotoksik dalam artian toksik terhadap sel merupakan suatu senyawa atau zat yang dapat merusak sel normal atau sel kanker. Kerusakan tersebut dapat dihambat pertumbuhannya dengan senyawa sitotoksik agar tidak menyebar dan membentuk sel tumor ganas. Senyawa sitotoksik berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker sebagai antikarsinogentik dan menghambat pertumbuhan sel kanker [15].

Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik pada suatu tumbuhan dapat dilakukan dengan uji pendahuluan antikanker dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap larva udang *Artemia.* Udang *Artemia* digunakan sebagai hewan uji untuk mengetahui aktivitas sitotoksik, karena ditemukan korelasi antara metode BSLT dengan sitotoksisitas dari *cell line* 9 KB (karsinoma nasofaring manusia) dan *cell line* P388 (leukemia murine *in vivo*) [2].

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol dan fraksi daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica.* L*.*) yang dilihat dari nilai LC50 yang didapatkan dari pengujian *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang *Artemia franciscana* Kellogg. Sehingga tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol dan fraksi daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica.* L*.*) yang didapatkan dari nilai LC50. Penelitian sitotoksik ini bermanfaat sebagai langkah awal untuk mencari kandidat obat baru dalam pengembangan pengobatan antikanker, dengan menggunakan daun kale keriting.

1. Metodologi Penelitian

Peneliti melakukan pengujian aktivitas sitotoksik dengan menggunakan daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica* L.) terhadap larva udang *Artemia franciscana* Kellog. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Farmasi Unisba dengan tahapan yang diawali dengan determinasi hewan dan tumbuhan, penyiapan bahan, pembuatan simplisia, pengujian parameter standar, ekstraksi, fraksinasi, skrining fitokimia, penyiapan hewan dan larutan uji, dan kemudian uji aktivitas sitotoksik BSLT dengan parameter kematian larva udang dan nilai LC50.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil ekstrak kental dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut aquadest, etil asetat, dan n heksan. Ekstrak dan fraksi daun kale keriting dilakukan uji aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) [2] menggunakan hewan uji larva udang *Artemia franciscana* Kellogg. Ekstrak dan fraksi daun kale keriting dibuat kelompok uji yang dibuat seri pada konsentrasi 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm, serta dibuat kelompok pembanding kontrol negatif, dan dilakukan secara *triplo.* Parameter yang didapatkan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik adalah angka kematian larva udang lalu dianalisis untuk mendapatkan nilai LC50. Nilai LC50 didapatkan dari analisis probit, yang ditentukan oleh regresi garis yang diperoleh dengan memplot konsentrasi terhadap persentase kematian dengan nilai probit [18].

1. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica* L.) yang didapatkan dari perkebunan *Ina Green* di Lembang, Bandung, Jawa Barat. Hayati (SITH), Institut Teknologi Bandung dengan hasil yang diperoleh adalah *Brassica oleracea* var. *sabellica* L. dari famili Brassicaceae. Sedangkan hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia franciscana* Kellog.

Penyiapan bahan uji dilakukan dengan sortasi basah, perajangan, sortasi kering, pengeringan, dan penyerbukan simplisia. Bahan segar daun kale keriting dipisahkan daun dari batangnya dan sortasi basah untuk membersihkan kotoran dari tanaman dan dicuci menggunakan air mengalir, kemudian dilakukan proses perajangan dan sortasi kering. Dilakukan pengeringan didalam lemari pengering dengan suhu 40-50°C. Kemudian daun kale keriting yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender* dan disimpan di wadah yang tertutup rapat [3]. Penyerbukan simplisia menjadi bentuk yang lebih halus akan mempengaruhi mutu ekstrak, karena semakin halus simplisia, proses ekstraksi akan lebih efektif dan efisien [4].

Ekstraksi daun kale keriting dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Serbuka simplisia daun kale keriting sebanyak 900 gram di maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1500 mL dan hingga simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama 3 hari dengan sesekali dilakukan pengadukan dan pergantian pelarut atau remaserasi setiap 24 jam. Hasil maserasi atau ekstrak cair disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50-53°C hingga menghasilkan ekstrak kental. Pemekatan merupakan sebuah proses peningkatan jumlah senyawa terlarut secara penguapan pelarut hingga terbentuk ekstrak kental namun tidak mencapai kondisi kering [4]. Setelah pemekatan menggunakan *rotary vacuum evaporator*, dilakukan pengentalan kembali menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C dengan tujuan untuk menghasilkan ekstrak yang lebih kental. Didapatkan ekstrak kental hasil maserasi sebanyak 116,28 gram dengan rendemen 12,92%.

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan ekstrak kental daun kale keriting sebanyak 10 gram dalam 100 mL pelarut aquadest , n-heksan, dan etil asetat (1:1) [1]. Didapatkan ketiga fraksi, dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C hingga didapatkan fraksi kental. Hasil rendemen fraksinasi berturut-turut didapatkan fraksi air 75,22%, fraksi etil asetat 1,50%, dan fraksi n-heksan 1,63%. Persentase hasil rendemen yang diperoleh dari setiap pelarut fraksinasi berbeda-beda, hal ini disebabkan oleh perbedaan kemampuan pelarut dalam menarik senyawa selama proses fraksinasi.

Pengujian parameter standar dilakukan terhadap simplisia yang bertujuan untuk mengetahui kualitas mutu dan keamanan suatu bahan yang akan digunakan [4]. Pengujian dilakukan dengan 2 proses yaitu parameter spesifik dan parameter non spesifik. Parameter spesifik merupakan parameter standar secara kualitatif dan kuantitatif yang berkaitan dengan kadar senyawa aktif dalam bahan dan berkaitan dengan aktivitas farmakologi dari suatu bahan [14].

**Tabel 1** Hasil pengujian parameter spesifik



Parameter non spesifik merupakan parameter yang dianalisis secara fisika, kimia, dan mikrobiologi yang berkaitan dengan stabilitas dan keamanan bahan [14].

**Tabel 2** Hasil pengujian parameter non spesifik



Penapisan fitokimia merupakan pengujian identifikasi secara kualitatif yang bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan aktif senyawa metabolit sekunder tertentu yang terkandung dalam suatu sampel. Penapisan dilakukan terhadap sampel simplisia, ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan dari daun kale keriting (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.)

**Tabel 3** Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia, Ekstrak, dan Fraksi



**Keterangan:** (+) = Terdeteksi (-) = Tidak terdeteksi

Pengujian sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* yang dilakukan terhadap ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan dari daun kale keriting (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.) pada hewan uji larva udang *Artemia franciscana* Kellogg. Hewan uji *Artemia salina* yang digunakan adalah larva udang yang berumur 48 jam atau pada fase nauplii, pada fase tersebut berdasarkan morfologinya larva udang sudah memiliki mulut dan kehabisan cadangan makanan, sehingga larva akan sensitif dengan sampel uji yang digunakan [5].

Sampel uji ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan dari daun kale keriting (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.) masing-masing dibuat pada konsentrasi 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm. Setiap konsentrasi dilakukan secara triplo dan dibuat larutan kontrol negatif. Larutan kontrol negatif berisi DMSO sebanyak 1 mL atau sebanyak jumlah penambahan untuk masing-masing sampel pada larutan induk. DMSO pada pembuatan larutan induk digunakan sebagai pelarut peningkat kelarutan untuk sampel yang kurang larut dalam air laut.

Hasil pengujian sitotoksik dilakukan dengan pengolahan data menggunakan LC50 (*Lethal Concentration*) atau 50% kematian, dalam artian hasil diolah dengan menggunakan data % mortalitas larva udang setiap sampel pada masing-masing konsentrasi. LC50 didapatkan dari persen kematian yang didapatkan dari rerata kematian pada setiap replikasi yang kemudian dianalisis menggunakan analisis probit. Analisis probit merupakan analisis pengolahan data tabel statistik. Nilai LC50 didapatkan dari anti log nilai x konsentrasi dari regrsi linier antara nilai probit (50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dan x sebagai nilai log konsentrasi.

**Tabel 4** Data nilai LC50 ekstrak dan fraksi daun kale keriting (Brassica oleracea var. sabellica. L.) terhadap larva udang Artemia franciscana Kellog



Berdasarkan **Tabel 4**, kelompok uji masing-masing terdapat pengujian terhadap konsentrasi 0 ppm, yang diasumsikan sebagai kelompok kontrol negatif karena pada kelompok kontrol hanya berisi air laut dan DMSO sejumlah penambahan untuk pelarutan sampel. Digunakannya kelompok kelompok kontrol negatif bertujuan agar hasil kematian pada pengujian benar-benar disebabkan karena sampel uji yang digunakan. Hasil persen kematian dari kontrol negatif adalah 0%, sehingga kematian larva udang pada kelompok uji lainnya disebabkan oleh metabolit sekunder dari sampel.

Efek toksisitas dinilai dari LC50, yang diperolah dari hasil pengujian sampel ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan termasuk ke dalam kategori toksik karena keempat sampel tersebut memiliki nilai LC50 yang kurang dari 1000 ppm. Suatu senyawa dikatakan toksik jika nilai LC50 kurang dari 1000 ppm, sangat toksik jika LC50 kurang dari 30 ppm, dan tidak toksik jika LC50 lebih dari 1000 ppm [16].

Efek toksisitas daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica*. L.) dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder pada masing-masing sampel. Dari keempat sampel uji, kandungan metabolit sekunder yang menjadi dugaan utama penyebab kematian larva adalah alkaloid, flavonoid, fenol, dan steroid. Flavonoid dan fenol terdapat pada sampel uji ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi etil asetat. Sedangkan steroid terdapat pada sampel uji ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan.

Alkaloid sebagai antikanker dapat menghambat mekanisme pembelahan dan pengaktifan jalur apoptosis sel kanker [7]. Flavonoid sebagai antikanker dapat memodulasi aktivitas enzim ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berpartisipasi dalam penahanan siklus sel, menginduksi apoptosis, dan menekan proliferasi dan invasi sel kanker [10]. Fenol memiliki sifat antioksidan yang kuat dan dapat mencegah stress oksidatif. Stres oksidatif berperan dalam sel kanker, karena dapat menginduksi kerusakan dari berbagai komponen dalam sel seperti karbohidrat, protein, lemak dan DNA. Kerusakan DNA dapat memicu replikasi sel kanker dan menimbulkan metabolisme sel yang dipercepat, sehingga sel-sel tubuh lain akan mudah terpapar [9][13]. Steroid sebagai antikanker memiliki mekanisme sebagai enzim penghambat pertumbuhan sel kanker payudara yaitu enzim aromatase inhibitor [17].

Nilai LC50 dari sampel uji fraksi n-heksan memiliki nilai paling rendah, sehingga memiliki efek sitotoksik yang lebih tinggi. Dengan kandungan metabolit sekundernya yaitu steroid, yang juga terkandung dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat. Sedangkan pada fraksi air memiliki kandungan utama flavonoid dan fenol. Sehingga senyawa steroid yang terkandung dalam ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi dan identifikasi senyawa steroid dari daun kale keriting.

1. Kesimpulan

Daun kale keriting (*Brassica oleracea var. sabellica*. L.) memiliki aktivitas sitotoksik yang didapatkan dari pengujian *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang Artemia franciscana Kellogg. Didapatkan nilai LC50 berturut-turut pada ekstrak etanol 226,9342 ppm, fraksi air 695,8249 ppm, fraksi etil asetat 52,9053 ppm, dan fraksi n-heksan 45,5826 ppm menunjukan kategori toksik terhadap larva udang *Artemia franciscana* Kellogg.

Acknowledge

Terima kasih kepada dosen pembimbing, dosen pengajar, dan seluruh pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Anjaswati, D., Pratimasari, D., & Nirwana, A. P. "Perbandingan Rendemen Ekstrak Etanol , Fraksi n- Heksana , Etil Asetat , dan Air Daun Bit ( Beta vulgaris L .) Menggunakan Fraksinasi Bertingkat," *Stikes*, *1*(1), 1–6. 2021
2. Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. *Bioactive Products Natural: Detection, Isolation, and Structural Determination* (CRC Press (ed.); Second). Taylor & Francis Group, 2007, https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420006889
3. Depkes RI. *Materia Medika Indonesia* (Jilid V). Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989.
4. Depkes RI. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat*. Departemen Kesehatan RI, 2000.
5. Fadhli, H., & Hasanah, S. U. "Uji Sitotoksik Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Kangkang Katup (Bauhinia semibifida Roxb) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)," *SCIENTIA Jurnal Farmasi Kesehatan*, *9*(2), 141–145, 2019.
6. Ferioli, F., Giambanelli, E., D’Antuono, L. F., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Silva, A. S., Hayran, O., & Koçaoglu, B. "Comparison of leafy kale populations from italy, portugal, and turkey for their bioactive compound content: Phenolics, glucosinolates, carotenoids, and chlorophylls," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(14), 3478–3489, 2013, https://doi.org/10.1002/jsfa.6253
7. Gusungi, D. E., Maarisit, W., Hariyadi, H., & Potalangi, N. O. "Studi Aktivitas Antioksidan Dan Antikanker Payudara (MCF-7) Ekstrak Etanol Daun Benalu Langsat Dendrophthoe pentandra," *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*, *3*(1), 166–174, 2020, https://doi.org/10.55724/j.biofar.trop.v3i1.274
8. Hahn, C., Müller, A., Kuhnert, N., & Albach, D. "Diversity of Kale (Brassica oleracea var. sabellica): Glucosinolate Content and Phylogenetic Relationships," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3215–3225, 2016 https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01000
9. Hikmah, F., & Hardiany, N. S. "Peran Reactive Oxygen Species (ROS) Dalam Sel Punca Kanker," *Jurnal Kedokteran Yarsi*, *29*(3), 120–134, 2021.
10. Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. "Flavonoids as anticancer agents," *Nutrients*, *12*(2), 2020, https://doi.org/10.3390/nu12020457
11. Infodatin. InfoDATIN : Situasi Penyakit Kanker, 2019.
12. Nursafitri, E., K, U., Sari, I., Sari, R., Winda, & Sri Harti, A. "Kegunaan Daun Sirsak (Annona Muricata L) Untuk Membunuh Sel Kanker dan Pengganti Kemoterapi," *Jurnal KesMaDaSka*, *4*(2), 2013, https://jurnal.ukh.ac.id/index.php/JK/article/view/70
13. Osipova, V., Gracheva, Y., Polovinkina, M., Burmistrova, D., & Berberova, N. "Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Aromatic Oligosulfides," *Molecules*, *27*(12), 2022, https://doi.org/10.3390/molecules27123961
14. Pandapotan Marpaung, M., & Septiyani, A. "Penentuan Parameter Spesifik Dan Nonspesifik Ekstrak Kental Etanol Batang Akar Kuning (Fibraurea chloroleuca Miers),"  *Journal of Pharmacopolium*, *3*(2), 58–67, 2020.
15. Purwanto, N., Rismawati, E., & Sadiyah, esti R. "Uji Sitotoksik ekstrak biji salak (Salacca zalacca (Gaert) Voss dengan menggunakan metode Brine Shrimp lethality test (BSLT)," *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisiba*, 616–622, 2015.
16. Rahmi, A., Afriani, T., & Aini, A. "Cytotoxic test of extract and fractions from Blumea balsamifera leaves using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)," *Jurnal Ilmiah Farmasi*, *18*(1), 26–33, 2022, https://doi.org/10.20885/jif.vol18.iss1.art3
17. Sirait, P. S., Setyaningsih, I., & Tarman, K. "Anticancer Activity of Spirulina Cultivated in Walne and Organic Media," *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *22*(1), 50, 2019, https://doi.org/10.17844/jphpi.v22i1.25876
18. Waghulde, S., Kale, M. K., & Patil, V. "Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants," 47, 2020, https://doi.org/10.3390/ecsoc-23-06703
19. World Health Organization. (2018). WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents.