

UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN TUMBUHAN JINJIT (*Desmodium heterocarpon* [L] D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) TERHADAP LARVA *Artemia salina* Leach DENGAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Prayogi Kramy¹, Triawanti², Astri Widiarti³

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Palangka Raya, Palangka Raya

²Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Palangka Raya, Palangka Raya

³Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Palangka Raya, Palangka Raya

Abstrak

Latar belakang: Tumbuhan jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L] D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) adalah tumbuhan yang sering digunakan khususnya oleh masyarakat di daerah Kabupaten Gunung Mas. Tumbuhan ini sering digunakan oleh masyarakat setempat sebagai obat tradisional untuk mengobati apabila ada benjolan pada tubuh mereka.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kemampuan sitotoksik ekstrak etanol yang terdapat pada daun tumbuhan jinjit dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*. Digunakan hewan uji 180 ekor larva yang dibagi dalam 4 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 15 ekor dengan replikasi 3 kali. Ekstrak etanol daun jinjit diberikan ke dalam media dengan konsentrasi akhir, berturut-turut kelompok 1,2,3 dan 4 adalah 10 ug/ml, 100 ug/ml, 1000 ug/ml dan 0 ug/ml sebagai kontrol negatif. Analisis data untuk mengetahui nilai LC₅₀ dari daun tumbuhan jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L] D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) dianalisis menggunakan analisis Probit dengan *SPSS 19.0 for windows*

Hasil: Hasil dari analisis probit menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak etanol daun jinjit adalah 115.158 ug/ml. Rata – rata kematian larva konsentrasi 10 ug/ml, 100 ug/ml, 1000 ug/ml dan kontrol berturut-turut adalah 1, 6, 15 dan 0. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak menyebabkan jumlah kematian larva yang semakin tinggi.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak etanol daun jnjit bersifat sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hal ini ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 ug/ml dari ekstrak etanol daun jinjit yaitu 115.158 ug/ml.

Kata Kunci: *Desmodium heterocarpon* (L.) D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen, tumbuhan jinjit, *brine shrimp lethality test*, Sitotoksik

Citotoxic Test of Etanol Extract of Jinjit Leaves (*Desmodium heterocarpon* (L.) D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) Against *Artemia salina* Leach Larvae Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method.

Prayogi Kramy¹, Triawanti², Astri Widiarti³

¹*Undergraduate student, Medical Faculty of Palangka Raya University, Palangkaraya*

²*Lecturer, Medical Faculty of Palangka Raya University, Palangka Raya*

³*Lecturer, Medical Faculty of Palangka Raya University, Palangka Raya*

Abstract

Background: *Jinjit (*Desmodium heterocarpon* (L.) D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) is a plant that is often used, especially by people in the area of Gunung Mas regency. This plant is often used by local people as a traditional medicine for tumor in their bodies. The aims of this research is to know the ability of citotoxic etanol extract of jinjit leaves using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

Method: *An experimental research use Post Test Only Control Group Design. Total sampel were 180 Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) larvae. Fifteen larvae used ineach 4 groups with 3 times replication. Each group was consecutively given 10,100, 1000,0 µg/ml concentrate of ethanol extract of jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L.] DC.var.*Strigosum* Van Meeuwen), the fourth group was used as control. Data obtained by calculating amount of died larva in 24 hours after treatment. LC₅₀ value was analyzed by probit analysis using SPSS 19.0 for windows.*

Result: *The average mortality of larvae at a concentration of 10, 100, 1000, and 0 µg/m consecutively were 1, 6, 15 and 0. The higher the extract concentration led to a growing number of high larval mortality. LC₅₀ value of fruit extract of of jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L.] DC.var.*Strigosum* Van Meeuwen) was **115.158 µg/ml***

Conclusion: *The administering of jinjit leaves extract, in this reserach, had citotoxic activity against *Artemia salina* Leach larvae according to BSLT method. It is indicated by LC₅₀ value <1000 µg/ml.*

Keywords : **Desmodium heterocarpon* (L.) D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen, tumbuhan jinjit, brine shrimp lethality test, citotoxic*

PENDAHULUAN

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi dibidang pengobatan modern sampai saat ini mengalami peningkatan yang sangat pesat dan telah mendominasi pelayanan kesehatan formal,¹ tetapi hal ini tidak mampu begitu saja menghilangkan peran obat tradisional dari kehidupan masyarakat karena lekat dengan adat dan budaya bangsa. Menurut WHO 2005, obat tradisional sudah digunakan secara luas dan berkembang pesat di sistem kesehatan dunia.² Di Afrika, 80% populasi masyarakatnya menggunakan obat tradisional untuk membantu memenuhi kebutuhan pelayanan kesehatan mereka. Di Tiongkok, obat tradisional sudah digunakan sebesar 40% dari total sistem pelayanan kesehatan yang ada di negara tersebut. Sedangkan pada masyarakat Asia dan Amerika Latin, penggunaan obat tradisional sampai sekarang terus berlanjut dan berkembang pesat karena kepercayaan penduduknya terhadap sejarah adat dan budaya mereka.²

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara yang memiliki hutan tropis yang terdiri lebih dari 30.000 spesies dari 250.000 spesies tumbuhan yang ada didunia,³ Oleh karena itu Indonesia disebut negara “*mega diversity*” dengan keragaman hayati hutan tropis nomor dua tertinggi di dunia setelah Brasil, dan nomor satu untuk keanekaan hayati lautnya.⁴ Semua kekayaan hayati mengandung bahankimia yang berpotensi sebagai bahan baku industri farmasi, pertanian, makanan, dan minuman. Berdasarkan hal tersebut banyak tumbuh-tumbuhan

obat yang mempunyai khasiat tumbuh di Indonesia sehingga sering digunakan oleh masyarakatnya sebagai obat tradisional. Penggunaan tumbuhan obat tradisional ini semakin diminati masyarakat dan semakin populer karena obat tradisional lebih mudah didapat dan harganya lebih murah.⁵

Kalimantan Tengah memiliki kekayaan sumber daya alam yang melimpah, memiliki berbagai macam tumbuhan yang tumbuh subur di berbagai daerahnya. Oleh sebab itu Kalimantan Tengah banyak memiliki tumbuhan khas yang digunakan sebagai obat tradisional. Salah satu tumbuhan obat tersebut adalah tumbuhan jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L] D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen) yang sering digunakan khususnya oleh masyarakat di daerah Kabupaten Gunung Mas. Tumbuhan ini sering digunakan oleh masyarakat setempat sebagai obat tradisional untuk mengobati apabila ada benjolan pada tubuh mereka.

Hasil penelitian sebelumnya dengan metode DPPH tumbuhan *Desmodium heterocarpon* (L) D.C var.*Strigosum* Van Meeuwen ini diuji aktivitas antioksidannya menunjukkan bahwa tumbuhan ini memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.⁶ Selanjutnya uji antimikroba yang dilakukan terhadap beberapa bakteri gram negatif terhadap ekstrak dari tumbuhan *Desmodium heterocarpon* (L) D.C var.*heterocarpon* yang khususnya banyak tumbuh di daerah Bangladesh memiliki aktivitas antibakteri.⁷ Akan tetapi, belum ada penelitian tentang potensi sitotoksik tumbuhan *Desmodium heterocarpon* (L) D.C

var.*Strigosum* Van Meeuwen asal Kalimantan Tengah. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan sitotoksiknya sebelum diujicobakan pada sel kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kemampuan sitotoksik ekstrak etanol yang terdapat pada daun tumbuhan jinjit dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT ini sering digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan, karena relatif murah, cepat, mudah, dan hasilnya dapat dipercaya, serta merupakan praskrining untuk obat antikanker.⁸ Hasil dari penelitian ini diharapkan nantinya dapat dijadikan sebagai bahan informasi mengenai kemampuan sitotoksik dan senyawa aktif dari ekstrak etanol daun tumbuhan jinjit.

METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah daun jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L.] DC. Var.*Strigosum* Van Meeuwen), telur *Artemia salina* Leach, etanol 96%, NaCl, dan Aquades.

Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah tabung reaksi, gelas kimia, pipet mikro, pipet tetes, kaca arloji, bejana/wadah penetasan, termometer, timbangan digital, dan *rotary evaporator*.

Cara kerja

Preparasi sampel

Daun tumbuhan jinjit diambil di daerah Kelurahan Tewah, Kabupaten Gunung Mas, Kalimantan Tengah. Daun jinjit dibersihkan dengan air bersih dan mengalir. Selanjutnya daun jinjit dikeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung.

Pembuatan ekstrak etanol daun jinjit.

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Daun jinjit direndam dengan etanol 96% selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditampung di botol kaca. Selanjutnya pelarut etanol yang digunakan diuapkan dengan *Rotary Evaporator* tekanan vakum pada suhu 50°C, dengan kecepatan rotary 90 rpm. Kemudian dilanjutkan dengan pemekatan menggunakan *water bath* hingga ekstrak pekat.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach

Untuk menetasakan telur *Artemia salina* Leach disiapkan air laut buatan yaitu dengan cara menambahkan satu setengah sendok makan garam tanpa yodium dalam satu liter air. Telur larva diambil secukupnya dan kemudian direndam dalam air laut buatan tersebut kemudian diberi aerasi selama 24 hingga telur menetas. Larva siap digunakan untuk uji bila sudah berumur 48 jam.⁹

Pembuatan serial konsentrasi

Dibuat larutan ekstrak 2000 ug/ml dengan cara melarutkan 40 mg ekstrak kental daun jinjit dalam 20 ml air laut buatan. Untuk ekstrak

yang sukar larut, dapat ditambahkan DMSO 1% (5 tetes) untuk meningkatkan kelarutan. Konsentrasi 200 ppm dibuat dengan memipet 2 ml larutan ekstrak 2000 ppm dan ditambahkan air laut buatan hingga 20 ml. Konsentrasi 20 ppm dibuat dengan memipet 2 ml larutan 200 ppm dan ditambahkan air laut buatan hingga 20 ml. Larutan sampel 1000 ug/ml dibuat dengan cara memipet 5 ml larutan ekstrak 2000 ug/ml dan ditambahkan 5 ml air laut buatan. Konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara memipet 5 ml ekstrak konsentrasi 200 ug/ml dan ditambahkan air laut buatan 5 ml. Larutan sampel 10 ug/ml dibuat dengan cara memasukkan larutan ekstrak 20 ug/ml dan ditambahkan 5 ml air laut buatan.

Uji Sitotoksik dengan metode BSLT

Uji dilakukan dengan memasukkan 15 ekor larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam kedalam vial yang telah berisi larutan ekstrak dan air laut buatan.^{10,11} Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali ulangan (triplo).^{12,13} Vial uji diletakkan dibawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah dan persen kematian larva.¹⁰ Kriteria standar untuk menilai kematian larva adalah bila larva tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi. Hasil dibandingkan dengan kontrol negatif.

Rumus untuk menghitung persen kematian larva adalah sebagai berikut :

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

Apabila ada kontrol yang mati, persen kematian ditetapkan dengan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah kematian} - \text{jumlah kematian kontrol}}{\text{Jumlah larva awal}} \times 100$$

Analisis data

Analisis data untuk mengetahui nilai LC₅₀ dari daun tumbuhan jinjit dianalisis menggunakan analisis Probit dengan SPSS 19.0 for windows.

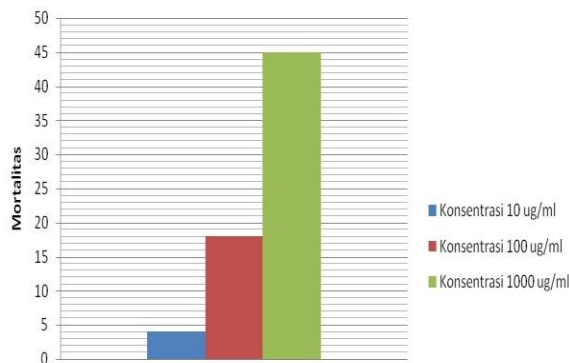
Suatu zat dikatakan sangat toksik bila LC₅₀ < 30 ug/ml, toksik bila LC₅₀ > 30-1000 ug/ml dan tidak toksik bila LC₅₀ > 1000 ug/ml.¹⁴

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan masing-masing konsentrasi dalam tiap tabung mampu membunuh larva *Artemia salina*. Jumlah larva *Artemia salina* yang mati dalam tiap tabung untuk setiap konsentrasi ekstrak etanol daun jinjit ditunjukkan dalam table 1. Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa setiap konsentrasi ekstrak etanol daun jinjit menunjukkan pengaruh yang berbeda-beda terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak menyebabkan jumlah kematian larva yang semakin tinggi.

Tabel 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L.] DC. var.*Strigosum* Van Meeuwen) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Replikasi ke-	Jumlah kematian larva tiap konsentrasi			Kontrol (-)	Volume akhir media
	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml		
1	1	4	15	0	5 ml
2	2	9	15	0	5 ml
3	1	5	15	0	5 ml
Total kematian	4	18	45	0	
Rata - rata	1.3	6	15		
Persentase kematian	8.89%	40%	100%		



Grafik 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun jinjit (*Desmodium heterocarpon* [L.] DC. var.*Strigosum* Van Meeuwen) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Hasil analisis probit dengan SPSS 19.0 for Windows menunjukkan harga LC₅₀ ekstrak etanol daun jinjit adalah 115.158 ug/ml.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan suatu bioassay untuk mendeteksi dari suatu ekstrak tumbuhan yang berhubungan kemampuan sitotoksik dan antitumor. Suatu ekstrak dikatakan

aktif dan memiliki kemampuan sebagai antikanker menurut metode BSLT jika harga LC₅₀ <1000 ug/ml.⁸ Larva *Artemia salina* Leach yang digunakan sebagai hewan uji pada penelitian ini adalah saat berumur 48 jam, hal tersebut dikarenakan pada umur 48 jam banyak terjadi mitosis pada sel yang terdapat pada tubuh larva sehingga menyerupai sel kanker. Hasil pengujian menunjukkan harga LC₅₀ dari ekstrak etanol daun jinjit adalah 115.158 ug/ml, sehingga dapat dikatakan ekstrak daun jinjit memiliki aktifitas antikanker menurut metode BSLT.⁸

Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun jinjit menunjukkan adanya senyawa flavonoid.⁶ Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki kemampuan antikanker. Beberapa mekanisme Flavonoid sebagai antikanker adalah mencegah aktifitas metabolik karsinogen, sebagai antiproliferasi, menghambat siklus sel, dan induksi apoptosis.^{15,16,17,18}

Salah satu mekanisme yang paling penting dimana flavonoid dapat menimbulkan efeknya adalah melalui interaksi dengan enzim metabolisme fase I (misalnya, sitokrom P450), yang secara metabolik mengaktifkan sejumlah besar prokarsinogen untuk mengaktifkan kembali zat yang dapat berinteraksi dengan nukleofil selular dan akhirnya memicu karsinogenesis. Flavonoid menghambat aktivitas isozim P450 tertentu, seperti CYP1A1 dan CYP1A2, sehingga Flavonoid cenderung memiliki peran protektif terhadap induksi kerusakan sel oleh aktivasi karsinogen. Mekanisme lainnya adalah induksi enzim metabolisme fase II (misalnya, GST, reduktase kuinon, dan UDP-GT) dimana karsinogen akan didetoksifikasi dan dieliminasi dari tubuh. Hal ini membantu dalam menjelaskan efek kemopreventif flavonoid terhadap karsinogenesis.¹⁵

Mekanisme molekuler antiproliferasi Flavonoid melibatkan penghambatan proses prooksidan yang menyebabkan promosi tumor. Peningkatan pertumbuhan oksidan dan ROS adalah katalis utama dari tahap promosi dan progresi tumor. Flavonoid efektif dalam menghambat xantin oksidase, COX atau LOX55, yang berarti dapat menghambat proliferasi dari sel tumor.¹⁵

Selain itu flavonoid juga memiliki mekanisme penghambatan biosintesis poliamina yang berpengaruh pada proses proliferasi sel. Ornithine dekarboksilase adalah *rate-limiting enzim* dalam biosintesis poliamina dan berkorelasi dengan tingkat sintesis DNA dan proliferasi sel di beberapa jaringan. Beberapa percobaan menunjukkan bahwa

flavonoid dapat menghambat ornithine dekarboksilase yang di induksi oleh promotor tumor menyebabkan penurunan berikutnya di poliamina dan penghambatan sintesis DNA dan protein.¹⁵

Gangguan dalam perkembangan siklus sel dapat menjelaskan efek anti kanker dari flavonoid. Karena sinyal mitogenik, sel-sel masuk ke dalam serangkaian langkah-langkah yang diatur sehingga melintasi dari siklus sel, dan cyclin-dependent kinase (CDKs) yang diakui sebagai regulator kunci dari perkembangan siklus sel. Perubahan aktifitas CDK adalah ciri dari patogen neoplasia. Terdapat beberapa jenis kanker yang berhubungan dengan aktivasi yang berlebihan dari CDKs karena adanya mutasi pada gen CDK atau gen CDK inhibitor. Pada checkpoint di G1 / S dan G2 / M dari siklus sel kanker telah ditemukan dapat di inhibisi oleh flavonoid seperti *silymarin, genistein, quercetin, daidzein, luteolin, kaempferol, apigenin, dan epigallocatechin 3-gallate*.^{15,19} Studi dari berbagai penelitian telah mengungkapkan bahwa flavopiridol bisa menginduksi penghambatan siklus sel, baik di G1 atau G2 / M dengan menghambat semua CDKs.¹⁴

Apoptosis merupakan bentuk aktif dari kematian sel yang memainkan peran penting dalam pengembangan dan kelangsungan hidup dengan menghilangkan sel yang rusak atau yang tidak diinginkan.¹⁷ Hal ini diatur secara ketat oleh suatu gen yang mempromosikan kelangsungan hidup sel apoptosis dan dimediasi melalui jaringan yang sangat terorganisir berinteraksi saling berinteraksi

dengan inhibitor protease dalam menanggapi rangsangan berbahaya dari dalam atau di luar sel. Disregulasi apoptosis memainkan peran penting dalam onkogenesis. Flavonoid telah terbukti menginduksi apoptosis dalam beberapa jenis sel kanker, namun tidak pada sel-sel normal.¹⁷ Mekanisme molekular dimana flavonoid menginduksi apoptosis belum diklarifikasi. Beberapa mekanisme yang mungkin terlibat, termasuk penghambatan aktifitas DNA topoisomerase I dan II,²⁰ penurunan ROS, pengaturan ekspresi heat shock protein, modulasi jalur sinyal, aktivasi endonuklease, dan menekan protein Mcl-1.¹⁵

Keterbatasan penelitian ini adalah suhu yang tidak teratur dapat mengganggu pertumbuhan larva sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Cangkang telur dan sisa-sisa penetasan larva dapat mempengaruhi pH air sehingga menjadi asam. Hal ini dapat mengakibatkan kematian larva.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun jinjit asal Kalimantan Tengah bersifat sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hal ini ditunjukkan dengan nilai LC 50 <1000 ug/ml dari ekstrak etanol daun jinjit yaitu 115.158 ug/ml, sehingga membuktikan adanya aktifitas antikanker menurut metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).

SARAN

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun jinjit memiliki kemampuan

sitotoksik, berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan penelitian lebih lanjut pada sel kanker untuk membuktikan adanya aktifitas antikanker dari daun jinjit. Selain itu, diperlukan penelitian lebih jauh untuk mengisolasi senyawa aktif yang memiliki kemampuan antikanker dari daun jinjit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia [internet]. Obat tradisional masuk dalam sistem pelayanan kesehatan formal; 2010 [cited 2013 jan 21]. Available from : <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1102-obat-tradisional-masuk-dalam-sistem-pelayanan-kesehatan-formal.htm/>
2. World Health Organization Geneva. WHO Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005; 2005 [cited 2013 Feb 18] Available at <http://www.who.int/medicines/organization/trm/orgtrmmain.shtml/>
3. UPT BPPTK LIPI Gunungkidul [internet]. Teknologi Kimia dan Lingkungan; 2012 [cited 2013 Mar 17] Available from : http://bpptk.lipi.go.id/bpptk2.1/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=62..
4. Dewan Nasional Perubahan Iklim. Economic Incentive Policies for REDD+ in Indonesia : Findings from OSIRIS Model, Policy Memo 02. Jakarta : DNPI 2010
5. Swantara IMD. Isolasi dan identifikasi Fraksi Toksik Ekstrak Tumbuhan Iler (*Coleus scutellarioides* [L] Bent).

- Indonesian Journal of Cancer 2010 ; 4 : 9-10
6. Tsai JC, Huang GJ, Chiu TH, Huang SS, Huang SC, Huang TH, et al. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. African journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011; 5 : 468 – 476.
 7. Hasan AA, Hasan CM, Azam AZ. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Desmodium heterocarpon*. Bangladesh Pharmaceutical Journal 2011; 14 : 49 – 52
 8. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nichols DE and McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica* 1982; 45: 31-34.
 9. Nasution PS. Karakterisasi simplisia, Skrining fitokimia, dan uji toksisitas dari ekstrak umbi Keladi Tikus (*tuber typhonii*) dengan metode Brine shrimp lethality test (BST) [Skripsi] Medan : Universitas Sumatera Utara; 2010.
 10. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2002; 2 : 1472-6570
 11. Astuti P, Alam G, Mae SHW, Sari D, Wahyuono S. Uji sitotoksik senyawa alkaloid dari spons *Petrosia* sp: potensial pengembangan sebagai antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia* 2005; 16 : 58 – 62
 12. Indrawati T, Rosliani S. Pembuatan Granul Ekstrak Kering Buah Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl] dengan Variasi Konsentrasi Adsorben. *Sainstech Farma* 2010; 1 : 10 – 18
 13. Hilmi Y, Abushama MF, Abdalgadir H, Khalid A, Khalid H. A study of antioxidant activity, enzymatic inhibition, and in vitro toxicity of selected traditional sudanese plants with anti-diabetic potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 ; 1-5. Available online <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/149>
 14. Widya, Roma D. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* L.) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalaticae* dan Jamur *Saprolegnia* sp. [Skripsi]. Medan : Universitas Sumatera Utara; 2009
 15. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids : A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 2011; 5(9): 1-12
 16. Susianti. Pengaruh Ekstrak Kloroform Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.) Terhadap Ekspresi Protein BCL-2 Pada Sel Hela. *Jurnal Sains MIPA*; Volume 16. 2010;1-7.
 17. Rachmawati E, Karyono S, Suyuti H. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *Jurnal*

- Kedokteran Brawijaya; Volume 27 (1). 2012;28-33.
18. Wicaksono MHB, Permana S. Potensi Fraksi Etanol Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra) Sebagai Agen Anti Kanker Kolon Pada Mencit (Mus musculus Balb/c) Setelah Induksi Dextran Sulvat (DSS) dan Azoxymethane (AOM). Jurnal Biotropika; Edisi 1 (2). 2013;75-79.
 19. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids : Promising anticancer agents. Medicinal Research Reviews 2003; 23 : 519 – 543
 20. Russo P, Bufalo AD, Cesario A. Flavonoids acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives in cancer therapy. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2012 [cited 7 Januari 2014]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998568>