

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK
FRAKSI KLOOROFORM DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN WARU
(*Hibiscus tiliaceus* L.) PADA SEL KANKER SERVIKS HELA SECARA *IN*
VITRO DAN *IN SILICO***

***Antioxidant and Cytotoxic Activity Test of Chloroform Fraction from Ethanolic
Extract of Hibiscus Leaves (*Hibiscus tiliaceus* L.) against HeLa Cervical Cacer Cell
Line *In Vitro* and *In Silico****

Pharmacy Study Programme, Faculty of Medicine and Health Science
Muhammadiyah University of Yogyakarta
Hanik Chafidhoturrofiah*, Rifki Febriansah
hanieqchr@gmail.com

ABSTRACT

Hibiscus tiliaceus L. is a plant that can be used as a chemopreventive agent. On the trunk of hibiscus plants, there is a coumarin compound that has functions as a cytotoxic agent named hibiscusin. *H. tiliaceus* leaves can inhibit the proliferation of gastric cancer cells, colon cancer cells, and breast cancer cells. Coumarin is reported had a function as an antioxidant with the ability to reduce free radicals. This research has been done the identification of chemical constituents, antioxidant and cytotoxic assay of chloroform fraction hibiscus leaves (*Hibiscus tiliaceus* L.) against HeLa cervical cancer cells and molecular docking analysis of hibiscusin and EGFR.

Preparation of the extract was carried out by maceration method using 70 % ethanol and then fractionated liquid-liquid extraction with chloroform. Antioxidant power of chloroform fraction was then measured. Identification of chemical constituent hibiscus leaves was done by thin layer chromatography. Testing was conducted using the DPPH antioxidant and cytotoxic test using MTT assay method. In this study also performed molecular docking analysis hibiscusin compounds suspected to have anti-cancer effects of the protein Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

TLC profile of chloroform fraction showed *H. tiliaceus* leaf spots with Rf 0,76 and color light blue as same as the coumarin standard. Antioxidant test of chloroform fraction's hibiscus leaves had IC₅₀ value 51 µg/ml. Cytotoxic test of chloroform fraction's hibiscus leaves produced IC₅₀ value 206 µg/ml. In molecular docking analysis, hibiscusin could inhibit EGFR with docking score -77. This study showed that Chloroform fraction of *H. tiliaceus* leaves have strong antioxidant activity and weak cytotoxic effect. Hibiscusin had weaker bonds than the native ligand and had competitive bond with doxorubicin.

Keywords: *Hibiscus tiliaceus*, HeLa cells, Chemopreventive

INTISARI

Tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) adalah tanaman yang dapat digunakan sebagai agen kemopreventif. Pada batang *H. tiliaceus*, terdapat senyawa kumarin yang berfungsi sebagai agen sitotoksik yaitu *hibiscusin*. Pada bagian daunnya juga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker lambung, kolon, dan payudara. Kumarin mempunyai efek antioksidan dengan kemampuannya meredam radikal bebas. Pada kanker juga terjadi overekspresi dari *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) yaitu protein yang dapat meningkatkan proliferasi sel. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi kandungan kimia, pengujian antioksidan, uji sitotoksik fraksi kloroform daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) terhadap sel kanker serviks HeLa dan potensi penghambatan EGFR oleh *hibiscusin* melalui analisis *molecular docking*.

Daun *H. tiliaceus* diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%, difraksinasi dengan kloroform. Fraksi kloroform diukur daya antioksidannya. Identifikasi kandungan kimia daun *H. tiliaceus* dilakukan dengan KLT. Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan uji sitotoksik menggunakan metode MTT. Pada penelitian ini dilakukan analisis *molecular docking* senyawa *hibiscusin* yang diduga mempunyai efek anti kanker terhadap protein *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR).

Profil KLT fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* menunjukkan adanya bercak dengan Rf dan warna yang sama dengan standar kumarin (warna biru muda; Rf 0,76). Uji antioksidan fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memberikan nilai IC₅₀ 51 µg/ml. Uji sitotoksik fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* menghasilkan IC₅₀ 206 µg/ml. Pada analisis *molecular docking*, senyawa *hibiscusin* dapat menghambat EGFR dengan *score docking* sebesar -77. Penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan efek sitotoksik yang lemah. Senyawa *hibiscusin* mempunyai ikatan yang lebih lemah dibandingkan dengan *native ligandnya* namun kompetitif dengan doxorubicin.

Kata Kunci : *Hibiscus tiliaceus*, Sel HeLa, Kemopreventif

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit di mana sel-sel abnormal membelah secara tidak terkontrol dan mampu menyerang jaringan lain. Di Indonesia terdapat 20.928 wanita yang terserang kanker serviks pada tahun 2012 dan yang mengalami kematian sebesar 9.498 (Globocan, 2012). Salah satu pengobatan kanker adalah dengan kemoterapi, namun kemoterapi memberikan banyak efek samping. Hal ini dikarenakan kemoterapi tidak hanya mempengaruhi sel kanker tetapi juga mempengaruhi sel normal. Sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai bahan alam yang dapat digunakan sebagai agen kemopreventif

Agen kemopreventif digunakan sebagai agen pendamping kemoterapi untuk meningkatkan sensitivitas sel dan mengurangi efek samping. Agen kemopreventif umumnya memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan tumor melalui mekanisme *cell cycle arrest* (Saphiro and Harper, 1999), pemacuan apoptosis (Fisher, 1994) ataupun menghambat ekspresi protein yang berperan dalam *Multi Drug Resistance* (Kitagawa, 2006). Aktivitas kemopreventif juga dapat melalui mekanisme antioksidan, penetralan dan ekskresi senyawa karsinogen, atau melalui peningkatan kemampuan *DNA repair* (Beliveau and Gingras, 2007;

Katiyar *et al*, 2007; Surh and Na, 2008; Walaszek *et al*, 2004).

Salah satu tanaman yang diduga sebagai agen kemopreventif adalah tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). Daun *H. tiliaceus* memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker lambung, sel kanker kolon dan sel kanker payudara (Uddin *et al*, 2011). Pada bagian batang tanaman *H. tiliaceus*, memiliki kandungan senyawa kumarin yang dapat berfungsi sebagai agen sitotoksik yaitu *hibiscusin* (Chen *et al*, 2006). Selain berfungsi sebagai agen sitotoksik kumarin dilaporkan juga dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan kemampuannya meredam radikal bebas (Kostova *et al*, 2011). Pada kanker terjadi overekspresi dari Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) yang merupakan protein pada membran sel yang berikatan secara eksklusif dengan *growth factor* atau faktor pertumbuhan. Adanya overekspresi dari protein ini menyebabkan pertumbuhan dari sel kanker sehingga dalam pengobatan kanker juga diperlukan suatu senyawa yang dapat menghambat EGFR. Penghambatan EGFR oleh suatu senyawa dapat dilihat menggunakan analisis molecular docking.

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi kandungan kimia, uji aktivitas antioksidan, uji sitotoksik fraksi kloroform daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) terhadap sel kanker serviks HeLa dan

analisis *molecular docking hibiscusin* terhadap EGFR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental bersifat laboratoris dilakukan secara *in vitro* dan *in silico* di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Penelitian Universitas Ahmad Dahlan dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. pada bulan Juni 2013 hingga bulan Agustus 2013.

Ekstraksi

Daun *H. tiliaceus* yang akan digunakan, dikumpulkan dan selanjutnya dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian dikeringkan pada udara terbuka dan diserbuk menggunakan blender. Serbuk kering simplisia dimasukkan ke dalam bejana kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Perbandingan pelarut yang digunakan dan ekstrak adalah 1 : 10. Pada maserasi dilakukan pengocokan setiap hari selama 5 hari. Setelah 5 hari residu disaring dan dipisahkan dari filtrat dan dilakukan remaserasi selama 2 hari. Setelah 2 hari, residu disaring dan filtrat yang didapatkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C, maka akan didapatkan ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus*. Penguapan selanjutnya

dilakukan menggunakan penangas air agar didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental etanol kemudian dilakukan fraksinasi partisi cair-cair dengan pelarut kloroform. Proses fraksinasi ini dilakukan sampai perubahan warna dan pemisahan terlihat jelas. Fraksi kloroform kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C. Setelah fraksi kloroform dipekatkan kemudian dikentalkan dengan penangas air.

Identifikasi Senyawa dengan KLT

Senyawa pada fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* diidentifikasi menggunakan KLT. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah toluen-eter dengan perbandingan 1 : 1.

Molecular Docking

Data struktur protein target diambil melalui *Protein Data Bank* (PDB) dan digunakan sebagai target *docking* dengan PDB ID: 3W32. Struktur dari zat aktif bahan alam digambar menggunakan *MarvinSketch* v. 5.6. Setiap senyawa diprotonasi pada pH 7,4 kemudian dicari konformasinya menggunakan program yang sama agar terlihat dalam bentuk 3 dimensi dan disimpan dalam format .mol2. Protein target dipreparasi menggunakan YASARA, yaitu berkas protein dalam format pdb, kemudian dihapus salah satu rantai proteinnya. Selanjutnya NAG dan air dihapus Hasilnya kemudian disimpan dalam bentuk mol2 yang akan

digunakan sebagai *protocol docking* untuk penapisan virtual senyawa EGFR. *File* input ligan dan *file* protein target disimpan bersama dalam sebuah folder bersama PLANTS versi 1.2, kemudian ditentukan konformasi *docking* yang merupakan modifikasi dari konfigurasi standar dari PLANTS. Konformasi yang memiliki nilai terbaik kemudian dipilih sebagai tempat sampel berikatan. Kemudian *docking* ligan asli dilakukan perhitungan *Root Mean Square Deviance* (RMSD) menggunakan YASARA. Apabila nilai RMSD kurang dari 2Å maka dapat digunakan sebagai *protocol docking* untuk skrining virtual berikutnya.

Uji Antioksidan Preparasi Sampel

Larutan DPPH 0,2 mM (78,8 µg/ml)

Sebanyak 19,72 mg serbuk DPPH dilarutkan dalam metanol hingga 25 mL. Sebanyak 10,0 mL larutan DPPH diambil dan ditambahkan methanol hingga volume 100 mL

Larutan Sampel

Sampel ekstrak dikeluarkan dari *freezer* dan diamkan hingga suhu kamar. 10,0 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan methanol hingga 10 mL. Diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/ml. Lima seri kadar larutan dibuat dengan cara memipet sejumlah sampel dan dilarutkan dengan pelarut methanol (90; 70; 50; 30; dan 10 µg/ml)

Panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH dipipet sebanyak 1000 µL dan tambahkan 1000 µL methanol ke dalam tabung ulir 10 mL. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan dibaca *spectra* panjang gelombang larutan tersebut rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi.

Panjang gelombang maksimum sampel

Sebanyak 1000 µL larutan sampel dipipet dan ditambahkan 1000 µL methanol kedalam tabung ulir 10 mL. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan baca *spectra* panjang gelombang larutan tersebut rentang 200-800 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan melihat nilai absorbansi tertinggi dari *spectra* panjang gelombang

Penentuan operating time sampel

Sebanyak 1000 µL larutan sampel dan tambahkan 1000 µL methanol kedalam tabung ulir 10 mL. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh selama 90 menit dan ditentukan waktu stabil dari absorbansi larutan sampel

Preparasi Uji Antioksidan Sampel

Larutan seri kadar standard sampel yang telah dibuat sebelumnya disiapkan. Sebanyak 1000 µL larutan sampel dipipet dan tambahkan 1000 µL methanol kedalam tabung ulir 10 mL.

Larutan dihomogenkan dengan bantuan *vortex*. Larutan didiamkan selama *operating time* (OT) yang diperoleh dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Nilai IC₅₀ dihitung dengan mengolah data absorbansi sampel menjadi % antioksidan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai nilai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan x = kadar dan y = % antioksidan.

Uji Sitotoksik

Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun kemudian dikeringkan. Setelah dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 lb dan dikeringkan menggunakan oven. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dilap.

Pembuatan larutan media dan media kultur

RPMI dilarutkan dalam aquadest kemudian ditambahkan 2 gram NaHCO₃

dan 2 gram Hepes. Larutan kemudian distirer hingga homogen dan dibuffer menggunakan HCl encer 1N sampai pH 7,2-7,4 yang diukur menggunakan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril 0,2 µm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI steril dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF.

Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan menambahkan larutan PBS dan resuspensikan perlahan jika perlu.

Larutan tersebut kemudian dibuang dan tambahkan 1 ml tripsin 2,5% pada sel. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan PBS agar merata dan diamkan selama 3-5 menit agar tripsin dapat bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 *rpm* selama 3 menit. Sel kemudian dicuci sebanyak dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 10^4 sel/100 μ l dan siap digunakan untuk penelitian.

Pembuatan larutan uji

Fraksi kloroform ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus* dibuat stok dengan kadar 2×10^5 μ g/ml dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi dalam media kultur.

Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT

Sel dengan kepadatan 10^4 sel per sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam agar beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Setelah diinkubasi 48 jam, kemudian media diambil dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji dalam bentuk tunggal (Fraksi kloroform ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus*) dan diinkubasi selama 48 jam.

Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian tambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT ke dalam masing-masing sumuran dan inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 μ L untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Ekstraksi dan Fraksinasi

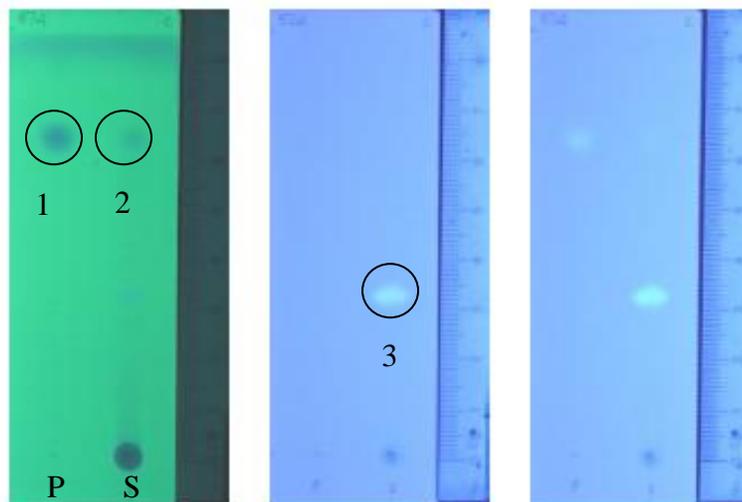
Ekstraksi daun *H. tiliaceus* dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Daun *H. tiliaceus* kering kemudian diserbuk menggunakan blender. Berat daun *H. tiliaceus* yang telah diserbuk adalah 1.250 gram. Kemudian serbuk daun *H. tiliaceus* dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10 selama 5 hari. Setelah 5 hari, kemudian daun *H. tiliaceus* disaring dan diremaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan yang sama selama 2 hari. Setelah 2 hari, daun *H. tiliaceus* disaring kembali dan didapatkan ekstrak cair

daun *H. tiliaceus* sebanyak 5.100 ml. Kemudian hasil maserasi difraksinasi dengan metode partisi cair-cair dengan kloroform menggunakan corong pisah. Hasil fraksinasi kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dipekatkan menggunakan penangas air dengan suhu 60°C. Dari 4 kg daun *H. tiliaceus* yang dimaserasi dan difraksinasi dihasilkan sebanyak 23,4 gram ekstrak kental fraksi kloroform daun *H. tiliaceus*.

Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa kumarin memberikan fluoresensi berwarna biru apabila dilihat menggunakan sinar UV 366 nm dan akan semakin kuat fluoresensinya ketika

disemprot dengan KOH-etanolik (Wagner *et al*, 1984). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat fluoresensi biru pada bercak standar kumarin dan fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* yang dilihat pada sinar UV 366 nm. Fluoresensi biru tersebut semakin jelas terlihat setelah disemprot dengan pereaksi KOH-etanolik. KOH-etanolik merupakan pereaksi semprot yang tidak spesifik mendeteksi adanya senyawa kumarin karena dapat juga digunakan untuk mendeteksi senyawa antraquinon yang akan memberikan warna merah dan senyawa antron yang akan memberikan warna kuning (Wagner *et al*, 1984).



Gambar 1. Profil KLT Fraksi Kloroform Daun *H. tiliaceus*. (a) sinar UV 254. (b) UV 366. (c) UV 366 setelah disemprot pereaksi KOH-metanolik, P : pembeding, S : sampel fraksi kloroform daun *H. tiliaceus*

Tabel 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Kloroform Daun *H. tiliaceus*

No. Spot	Warna	Harga Rf
1	Biru	0,76
2	Biru	0,76
3	Biru	0,39

Uji Antioksidan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan suatu senyawa ditunjukkan dengan adanya pengurangan intensitas warna ungu dari larutan DPPH yang telah ditambahkan larutan uji, sehingga dilakukan uji berbagai seri konsentrasi fraksi kloroform daun *H. tiliaceus*. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH menunjukkan serapan maksimum larutan DPPH terletak pada panjang gelombang 516 nm. Selanjutnya pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Mekanisme aktivitas antioksidan suatu senyawa berupa penangkapan radikal bebas DPPH dengan donasi proton kepada radikal sehingga radikal menjadi lebih stabil. Hal ini ditunjukkan dengan

perubahan warna ungu yang memudar pada DPPH dan penurunan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka akan semakin besar pula peredaman warnanya yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning.

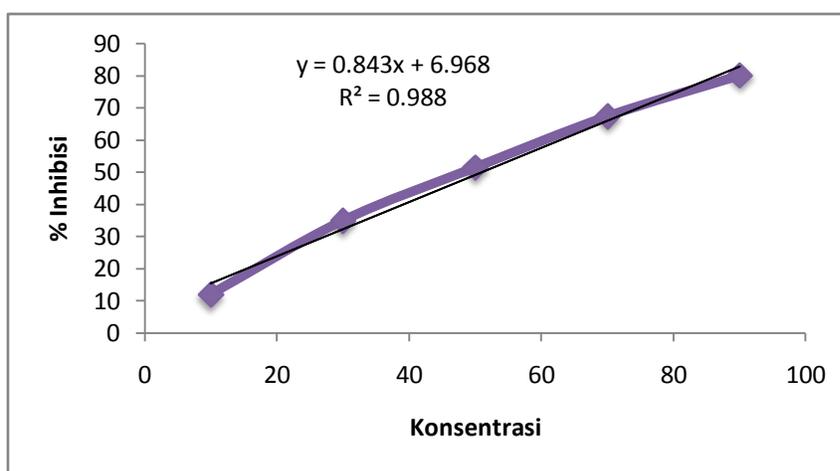
Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* dapat dilihat pada tabel 2. Pada pengujian aktivitas antioksidan ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Ariyanto, 2006). Hal ini ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* sebesar 51,046 µg/ml (tabel 3).

Tabel 2. Hasil Absorbansi Uji Antioksidan Fraksi Kloroform Daun *H. tiliaceus*

Konsentrasi (µg/ml)	10	30	50	70	90
Rep 1	0.603	0.466	0.348	0.231	0.134
Rep 2	0.609	0.474	0.358	0.255	0.162
Rep 3	0.613	0.444	0.302	0.19	0.106
Rep 4	0.660	0.484	0.382	0.261	0.170
Rata-rata	0.632	0.467	0.348	0.234	0.143

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Daun *H. tiliaceus*

Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Absorbansi	Aktivitas antioksidan ± SD	Persamaan
10	0.632	11.955 ± 0.040	y = 0,843x + 6,968
30	0.467	34.890 ± 0.013	
50	0.348	51.426 ± 0.024	R = 0,988
70	0.234	67.341 ± 0.021	
90	0.143	80.063 ± 0.020	IC ₅₀ = 51µg/ml



Gambar 2. Grafik Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Daun *H. tiliaceus*

Uji Sitotoksik (MTT assay)

Prinsip dasar MTT assay adalah mengukur aktivitas seluler berdasarkan aktivitas enzim suksinat dehidrogenase mitokondria sel untuk mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Enzim akan bereaksi dengan MTT membentuk Kristal formazan berwarna ungu dan jumlahnya sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Dari hasil pengujian, nilai absorbansi dari masing-masing dosis digunakan untuk menghitung besarnya persen (%) hidup sel dari setiap dosis. Dari tersebut dihitung nilai IC₅₀

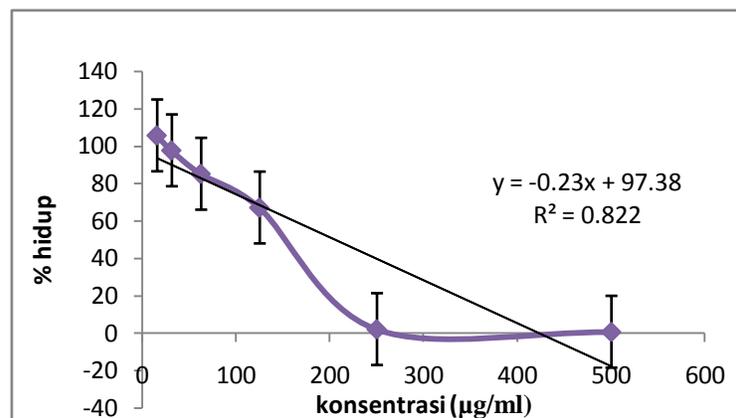
menggunakan persamaan regresi linier untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Berdasarkan tabel 4, dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 15,625 µg/ml terdapat 105% sel HeLa yang dapat hidup. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis tersebut belum cukup toksik untuk menghambat pertumbuhan sel Hela. Pada konsentrasi 31,25 µg/ml, sel yang dapat tumbuh sebesar 96% dan konsentrasi 62,5 µg/ml sel yang tumbuh sebesar 85%. Pada konsentrasi 125 µg/ml, persen hidup sel HeLa yaitu 67%.

Persen hidup sel HeLa mengalami penurunan yang signifikan pada konsentrasi 250 µg/ml dan 500 µg/ml yaitu 2% dan 0,6%. Hal ini memperlihatkan penurunan persen hidup dari sel HeLa seiring dengan peningkatan dosis.

Setelah melalui pengolahan data maka didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 206 µg/ml. Nilai IC₅₀ yang didapatkan menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* mempunyai efek sitotoksik yang lemah karena kurang dari 100 µg/ml (Meiyanto *et al*, 2008).

Tabel 4. Persen hidup sel HeLa dengan perlakuan fraksi kloroform daun *H. tiliaceus*

Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Abs Sampel	Viabilitas sel ± SD
500	0.116	0.627 ± 0.006
250	0.127	2.05 ± 0.022
125	0.645	67.029 ± 0.041
62.5	0.788	85.062 ± 0.01
31.25	0.888	97.573 ± 0.006
15.625	0.952	105.565 ± 0.025
Rata-rata Absorbansi	Kontrol	0,907
	Media	0,111
Persamaan	$y = -0.23x + 97.38$ $r = 0,822$ $IC_{50} = 206$	

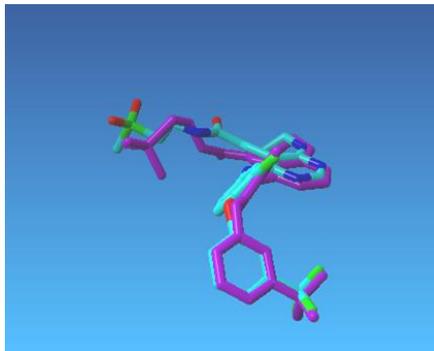


Gambar 3. Grafik hasil uji sitotoksik fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* terhadap sel kanker serviks HeLa

Molecular Docking

Pada *molecular docking* dilakukan perhitungan energi interaksi dari kedua senyawa. Senyawa target atau reseptor pada penelitian ini adalah *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Pada penelitian ini telah dilakukan *docking* antara senyawa *hibiscusin* yang dilaporkan memiliki efek sitotoksik dengan EGFR sebagai target yang diperoleh dari *Protein Data Bank* dengan kode 3W32. Analisis dilakukan dengan membandingkan ligan

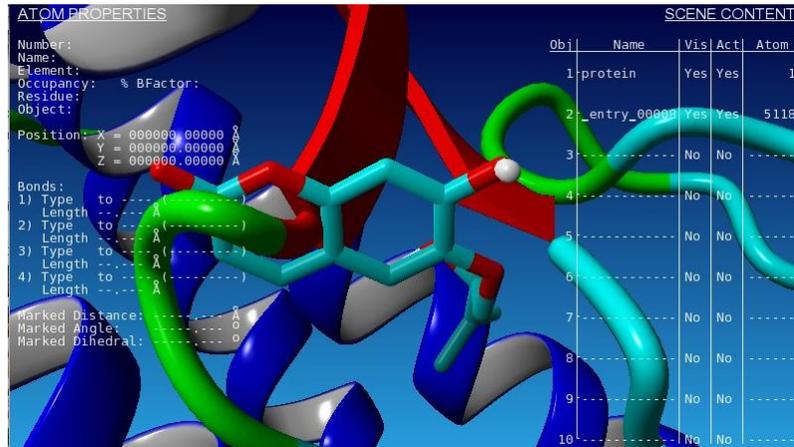
uji dengan *native ligand* reseptor. Hasil menunjukkan bahwa *native ligand* memiliki *score* yang lebih kecil dibandingkan dengan *score hibiscusin* yang dapat dilihat pada tabel 5. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kompleks ikatan protein EGFR dengan *native ligand* lebih stabil dibandingkan dengan senyawa uji. Hasil ikatan antara *hibiscusin* dengan EGFR dapat ditunjukkan pada gambar 6.



Gambar 4. Posisi *native ligand* W32 dan posisi prediksi *docking* dari simulasi *docking*. *Native ligand* (atom karbon diperlihatkan dengan warna biru muda), posisi prediksi *docking* dari simulasi *docking* (atom karbon diperlihatkan dengan warna ungu). Atom Nitrogen diperlihatkan dengan warna biru, atom oksigen diperlihatkan pada warna merah, atom Sulfur diperlihatkan dengan warna hijau.

Tabel 5. *Score docking ligand* dengan protein EGFR

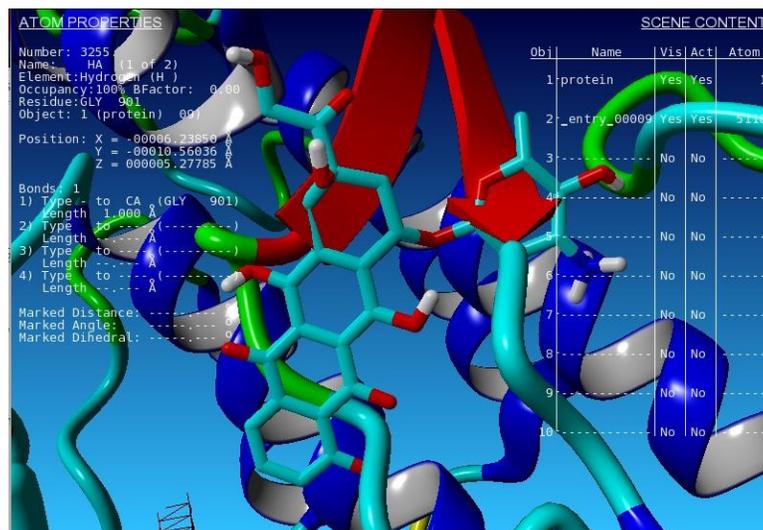
<i>Ligand</i>	<i>Score Docking</i> terhadap EGFR
<i>Native Ligand</i> (W32)	-102
<i>Hibiscusin</i>	-77
Doxorubicin	-89



Gambar 6. Ikatan antara *hibiscusin* dengan EGFR

Sedangkan apabila dibandingkan dengan pembandingnya yaitu doxorubicin, *hibiscusin* memiliki *score docking* yang lebih tinggi. Ikatan antara doxorubicin dan EGFR menghasilkan *score docking* sebesar -89. Hal ini

menunjukkan bahwa doxorubicin memiliki ikatan yang lebih kuat dengan EGFR dan lebih berpotensi dalam penghambatan EGFR. Ikatan antara doxorubicin dan EGFR dapat ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Ikatan antara doxorubicin dengan EGFR

Pembahasan

Kemopreventif adalah suatu penghambatan atau penundaan onset dari istilah yang biasa digunakan pada terjadinya suatu kanker. Beberapa agen

kemopreventif diidentifikasi dari senyawa alam sehingga secara farmakologi senyawa tersebut relatif aman (Aggarwal *et al*, 2004).

Daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) dapat menjadi tanaman yang berpotensi sebagai agen kemopreventif yang berbasis alam. Hal ini berkaitan dengan kandungan daun *H. tiliaceus* yang kemungkinan berpotensi sebagai agen kemopreventif yaitu senyawa golongan kumarin. Senyawa kumarin yang terkandung pada fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* kemungkinan memiliki efek yang sinergis dengan mekanisme tertentu. Kumarin adalah senyawa fenol yang umumnya berasal dari tumbuhan. Adanya kumarin pada tanaman daun *H. tiliaceus* ditunjukkan dengan hasil kromatografi lapis tipis dimana dapat terlihat pada plat KLT bercak fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki nilai Rf yang sama dengan standar yaitu 0,76.

Pada penelitian ini, fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dan menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 51 µg/ml. Nilai IC₅₀ tersebut lebih kecil dibandingkan nilai IC₅₀ dari ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus* yaitu 86,5 µg/ml (Ramproshad *et al*, 2012). Hal ini diduga dikarenakan pada ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus* masih banyak terdapat senyawa lain dan residu-residu yang menghambat efek antioksidan. Sehingga mengakibatkan

efek antioksidan yang dihasilkan belum dominan. Penelitian ini membuktikan bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki efek antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak etanolik daun *H. tiliaceus*.

Berdasarkan hasil uji sitotoksitas yang diinterpretasikan sebagai profil presentase kehidupan sel kanker serviks Hela terhadap konsentrasi ekstrak yang diujikan, fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* dapat menyebabkan efek sitotoksik terhadap sel kanker serviks Hela dengan nilai IC₅₀ sebesar 206 µg/ml. Nilai IC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki potensi yang lemah untuk menghambat proliferasi sel-sel kanker. Namun fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki efek yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanolik daun *H. tiliaceus* yang memiliki nilai IC₅₀ lebih dari 250 µg/ml dalam penghambatan sel kanker lambung, sel kanker kolon dan sel kanker payudara (Uddin *et al*, 2011). Hal ini diduga dikarenakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker banyak terdapat pada fraksi kloroform dibandingkan dengan ekstrak metanol daun *H. tiliaceus*. Pada ekstrak methanol kemungkinan masih banyak senyawa lain yang mengganggu efek sitotoksik yang dihasilkan. Kemungkinan lain yaitu senyawa yang terdapat dalam daun *H. tiliaceus* lebih berpotensi dalam penghambatan sel

kanker serviks HeLa dibandingkan sel kanker yang lain. Efek sitotoksik fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* berdasarkan fenomena bergantung dosis dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah persentase kehidupan sel. Senyawa kumarin yang terdapat pada fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* diperkirakan ikut berkontribusi terhadap efek sitotoksitas yang diberikan.

Senyawa yang berpotensi sebagai agen kemopreventif ditunjukkan dengan adanya mekanisme antioksidan, penetralan dan ekskresi senyawa karsinogen, atau melalui peningkatan kemampuan *DNA repair* (Beliveau and Gingras, 2007; Katiyar *et al.*, 2007, Surh and Na, 2008). Menurut beberapa peneliti, suatu senyawa dapat digolongkan sebagai agen kemopreventif dikarenakan adanya mekanisme dalam penghambatan proses transformasi, proliferasi dan invasi dari sel kanker (Aggarwal *et al.*, 2004). Salah satu mekanisme kemopreventif fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* adalah kemampuannya sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat menghambat perkembangan sel kanker. Mekanisme dari antioksidan berupa penangkapan radikal bebas DPPH dengan donasi proton kepada radikal. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna ungu yang memudar pada DPPH dan penurunan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang

maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Pengukuran penurunan serapan DPPH diukur berdasarkan serapan kontrol yaitu larutan DPPH tanpa penambahan larutan uji. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka akan semakin besar pula peredaman warnanya yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning. Mekanisme kemopreventif pada antioksidan terjadi pada fase inisiasi. Pada fase inisiasi, antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas yang terdapat pada senyawa-senyawa yang bersifat karsinogenik seperti radikal oksigen, peroksida, dan superoksida (Gordon, 1990). Radikal bebas adalah senyawa elektrofilik reaktif yang dapat bereaksi membentuk ikatan kovalen dengan makromolekul sel. Dengan adanya reaksi tersebut, radikal bebas akan menjadi stabil sehingga tidak dapat mengoksidasi DNA.

Mekanisme lain yang ditemukan pada agen kemopreventif adalah dengan penghambatan proliferasi atau pertumbuhan dari sel kanker. Penghambatan ini ditunjukkan dengan kemampuan menghambat *Cyclin D* dan faktor anti apoptosis pada sel kanker. Kumarin dapat memacu perubahan morfologi dan menurunkan persen hidup dari sel HeLa dengan mekanisme menginduksi *G0/G1 arrest*. Kumarin dapat menghambat ekspresi *Cyclin D1*, *Cdk 2* dan *Cdc 25A*. *Cyclin* adalah suatu protein yang berperan dalam siklus sel

yang akan mengaktivasi *Cyclin Dependent Kinase* untuk mengeluarkan sel dari fase G0 menuju fase G1 (Foster *et al*, 2001). Sel yang berada pada fase G0 atau dalam keadaan istirahat dapat memasuki siklus sel kembali jika sel merespon faktor pertumbuhan. Untuk memasuki fase G1, berbagai kompleks *cyclin-cdk* perlu diaktivasi. Dengan adanya penghambatan *cyclin D1*, *Cdk 2* dan *Cdc 25 A* maka sel tidak akan memasuki siklus sel kembali dan pertumbuhannya akan terhambat (Chuang *et al*, 2007).

Pada penelitian ini juga dilakukan analisis *molecular docking* *hibiscusin* terhadap *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). *Hibiscusin* merupakan suatu senyawa kumarin yang telah diteliti khasiatnya sebagai anti kanker pada tanaman *H. tiliaceus*, sedangkan EGFR adalah protein pada membran sel yang dapat berikatan dengan faktor pertumbuhan. Dalam kondisi normal ikatan ini akan mengaktivasi enzim *tirosin kinase* (TK) melalui jalur Ras/Raf/Map Kinase. Ketika *growth factor* terikat dengan reseptornya maka akan terjadi dimerisasi yang akan meningkatkan kemampuan enzimatik suatu reseptor. Reseptor yang terdimerisasi akan saling mengaktifkan satu sama lain dan akan terfosforilasi. Reseptor akan menjadi tempat ikatan bagi protein lain yaitu Grb₂ yang kemudian akan terikat dengan SOS. Apabila SOS teraktivasi maka akan

menyebabkan aktifnya Ras. Ras berfungsi menghantarkan *signal* dari reseptor *tirosin kinase* ke dalam nukleus. Ras yang teraktivasi akan mengaktifkan kinase seluler yaitu Raf-1 kinase. Raf-1 kinase akan memfosforilasi kinase seluler yang lain yaitu MEK dan MAPK sehingga akan memacu pertumbuhan sel. Pada analisis *molecular docking* *hibiscusin* memiliki *score docking* terhadap EGFR lebih tinggi dibandingkan dengan *native ligandnya* yang menunjukkan bahwa *hibiscusin* memiliki ikatan yang lebih lemah dibandingkan dengan *native ligandnya*. Apabila dibandingkan dengan doxorubicin, *hibiscusin* memiliki *score docking* yang lebih tinggi.

Infeksi *Human Pailoma Virus* (HPV) menyebabkan perubahan biologis pada ekspresi EGFR dengan terhambatnya degradasi EGFR (Soonthornthum *et al*, 2011). Salah satu penyebabnya adalah adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS). Adanya ROS ini akan mengaktivasi EGFR sehingga terjadi pertumbuhan sel kanker yang berlebihan (Chen *et al*, 2006). Hal ini dapat dihubungkan dengan mekanisme senyawa kumarin yang berpotensi sebagai antioksidan. Dengan adanya potensi tersebut, maka senyawa kumarin dapat menghambat aktivasi dari EGFR secara tidak langsung melalui peredaman radikal bebas. Berdasarkan hasil analisis *molecular docking* senyawa *hibiscusin* dapat menghambat aktivasi EGFR yang

ditunjukkan dengan *score docking* sebesar -77. Apabila dibandingkan dengan ikatan *native ligandnya* maka *hibiscusin* memiliki ikatan yang lebih lemah dan apabila dibandingkan dengan doxorubicin, maka *hibiscusin* memiliki kemampuan untuk berkompetisi dengan doxorubicin dalam kemampuannya untuk mengikat protein EGFR. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan *score docking* yang tidak terlalu jauh antara *hibiscusin* dan doxorubicin yaitu -77 dan -89.

Berdasarkan penelitian-penelitian di atas, dapat dilihat bahwa fraksi kloroform daun *H. tiliaceus* memiliki potensi penghambatan yang lemah terhadap sel kanker serviks HeLa. Sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai fraksi lainnya dari daun *H. tiliaceus* terhadap sel kanker serviks HeLa atau sel kanker lainnya dan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme lain agen kemopreventif seperti apoptosis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan, yakni:

1. Fraksi kloroform daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) mengandung senyawa kumarin yang dibuktikan pada kromatografi lapis tipis dengan nilai Rf 0,76.
2. Fraksi kloroform daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) memiliki

aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 51 µg/ml.

3. Fraksi kloroform daun waru memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC₅₀ sebesar 206 µg/ml.
4. Senyawa *hibiscusin* dapat berkompetisi dengan doxorubicin dalam menghambat protein *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) secara *molecular docking* dengan *score docking* sebesar -77.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, S, Rao A. V. "Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease." *Journal of American College of Nutrition*, 2000: 563-569.
- Ariyanto, A. *Uji Aktivitas antioksidan, Penentuan Kandungan Fenolik dan Flavonoid Total Fraksi Kloroform dan Fraksi Air Ekstrak Metanolik Pegagan (Centella asiatica L. Urban)*. Skripsi, Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, 2006.
- Basmal, J., Amin, S., Sugiyono, and Murniyati. *Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta, 2009. 208.
- Beliveau, R and Gingras, D. "Role of Nutrition in Preventing Cancer." *Can. Fam. Physician*, 2007: 1906-1911.
- Best, B. *benbest.com*. 2007. <http://www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html> (accessed January 6, 2014).
- Chen JJ, Huang SY, Duh CY, Chen IS, Wang TC, Fang HY. "A new cytotoxic amide from the stem wood

- of *Hibiscus tiliaceus*." *Planta Medica*, 2006: 935-938.
- Chrisnanto, E., Ismiyati, N., Medayati, B. D. *Cancer Chemoprevention Research Center*. 2013. http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=227 (accessed 2013).
- Chuang, H., Lee, E., Liu, Y. T., Lee, D., Ideker, T. "Network-based classification of Breast Cancer Metastases." *Journal of Molecular System Biology*, 2007: 140.
- DeFillips, R.A., Goodwin, E. C., Wu, L., and DiMaio, D. "Endogenous Human Papilloma Virus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells." *Journal of Virology*, 2003: 1551-1563.
- Fisher, D.E. "Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Treshold." *Cell*, 1994: 539-542.
- Fooster, J. S., Henley, D. S., Ahamed, S., Wimalasana, J. "Estrogen and Cell Cycle Regulation in Breast Cancer." *Trend in Endocrinology and Metabolism*, 2001: 320-327.
- Franks, L.M., and Teich, N. M. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*. New York: third edition Oxford University Press, 1998.
- Giorgi. "Flavonoid and Antioxidant." *Journal National Product*, 2000: 1035-1045.
- Globocan IARC*. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/factsheets_population.aspx?country=360 (accessed January 18, 2014).
- Goodwin, E., and DiMaio, D. "Repression of Human Papilloma Virus Oncogenes in Hela Cervical Caercinoma Cells Causes the Olderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways." *Biochemistry*, 2000: 12513-12518.
- Gordon, M.H. *The Mechanism of Antioxidant Activitu in Vitro*. London: Elseviere Applied Science, 1990.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. "Hallmark of Cancer: The Next Generation." 2011: 646-74.
- Harborne, J. B. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata*. Bandung: ITB, 1987.
- IPTEK (Ilmu Pengetahuan dan Teknologi)*. 2005. http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanoba_t/view.phpid=262.
- Jain, A.N., Nicholls, A. "Recommendations for Evaluations of Computational Method." *Journal of Comput. Aided Mol*, 2008: 133-139.
- Katiyar, S., Elmets, C.A. and Katiyar, S. K. "Green Tea and Skin Cancer: Photoimmunology, Angiogenesis and DNA Repair." *J. Nutr. Biochem*, 2007: 287-296.
- Kitagawa, S. "Inhibitory Effect of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport." *Biol. Pharm. Bull*, 2006: 1-6.
- Kostova, I., Bhatia, S., Grigorov, P., Balkansky, S., Parmar, V. S., Prasad, A. K., Saso, L. "Coumarins ans Antioxidants." *Medicinal Chemistry*, 2011: 8929-8951.
- Kresno, S. *Ilmu Dasar Onkologi*. Jakarta: PT Quparada Makuda Perkasa, 2003.
- Kumalaningsih, Sri. *Antioxidant Free Radical Naural Antidots*. Surabaya: Poster Anggrisarana, 2007.

- Kumar, V., Ramzi, S., Stanley, L. *Robbin Basic Pathology 7th Ed.* New York: Elsevier Inc, 2003.
- Kurnijasanti, R., Hamid, I.S., Rahmawati, K. "Efek Sitotoksik In Vitro dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma." *J. Peneliti Med Eksakta*, 2008: 48-54.
- Meiyanto, E., Susidarti, R. A., Handayani, S., Rahmi, F. "Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7." *Majalah Farmasi Indonesia*, 2008: 12-19.
- Meloan, C. E. *Chemical Separation*. New York: J. Willey, 1999.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York: McGraw-Hill Companies, 2003.
- National Cancer Institute*. 2013. <http://m.cancer.gov/types/ervical>.
- Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D. B. "Effect of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil." *J. Food Sci*, 2003: 487-190.
- Pokorni, J., Yyanishlewva, N., Gordon, M. *Antioxidant in Food; Practical Application*. New York: CRC Press, 2001.
- Pourmorad, F., Hosseimehr, S. J., Shahabimajd, N. "Antioxidant Activity, Phenol, and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants." *Journal of Biotechnology*, 2006: 1142-1145.
- Purnomo, H. *Kimia Komputasi: Molecular Docking PLANTS Penambatan Molekul PLANTS [Protein-Ligand-Ant-System]* (Ilmu Semut). Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 2011.
- Ramproshad, S., Afroz, T., Mondal, B., Haque, A., Ara, S., Khan, R., Ahmed, S. "Antioxidan and Antimicrobial Activities of Leaves of Medicinal Plants *Hibiscus tiliaceus* L." *Pharmacology Online*, 2010: 82-87.
- Rasjidi, I. *Panduan Penatalaksanaan: Kanker Ginekologi*. Jakarta: EGC, 2007.
- Riono, Y. *Kanker Leher Rahim*. Australia: Department of Surgery Holywood Hospital, 1999.
- Rohman, A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 2007.
- Shapiro, G. I. and Harper, J. W. "Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control." *J. Clin. Invest*, 1999: 1645-1653.
- Soonthornthum, T., Arias-Pulido, H., Joste, N., Lomo, L., Muller, C., Rutledge, T., Verschraegen, C. "Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer." *Ann Oncol*, 2011: 2166-78.
- Steben, M., Franco, E.D. "Human Papilloma Virus Infection: Epidemiology and Pathophysiology." *Gynecology Oncology*, 2007: 107.
- Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P.W., Portanova, J., Lee, J.C., Dubinett, S.M. "Specific inhibition of cyclo-oxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synt." *J. Immunol*, 2000: 361-70.
- Sudjadi. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: UGM Press, 1986.
- . *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius, 1985.

- Surh, Y., and Na, H. "NF- κ B and Nrf2 as Prime Molecular Targets for Chemoprevention and Cytoprotection with Anti-Inflammatory and Antioxidant Phytochemicals." *Genes Nutr*, 2008: 313-317.
- Syamsuhidayat, S.S and Hutapea, J.R. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1991.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K. "An Improved Colorimetric assay for Interleukin." *Journal of Immunol Methods*, 1986: 157-65.
- Tjay, Tan Hoan and Rhardja. *Obat-obat Penting Edisi Kelima*. Jakarta: Dirjen POM. Departemen Kesehatan RI. PT Elex Media Komputindo, 2002.
- Tsuji, M., Dubois, R. N. "Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing PProstaglandin Endoperoxide Synthase 2." *Cell*, 1995: 493-501.
- Tsuji, M., Kawano, S., Dubois, R. N. "Cyclooxygenase-2 Expression in human Colon Cancer Cells Increases Metastatic Potential ." *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997: 3336-3340.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., Dubois, R. N. "Cyclooxygenase Regulates Angiogenesis Induced by Colon Cancer Cells." *Cell*, 1998: 705-716.
- Uddin, S. J., Grice, D., Trialonggo, E. "Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extract." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1-7.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. *Plant Drug Analysis translated by A. Scott*. German: Spingerverlag Baerlin Heidelberg, 1984.
- Wanasundra., Shahidi, F. *Antioxidant: Science, Technology, and Applications*. Newfoundland: Agriculture and Agrifood Canada Saskatoon Research Center, 2003.
- Winarsi. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius, 2007.
- Yatim, Faisal. *Penyakit Kandungan*. Jakarta: Pustaka Populer Obor, 2005.
- Zbigniew, W., Margaret, H., Thomas, S. "Mechanism of Chemoprevention." *Journal of Biomed Experts*, 2004: 125.
- Zikrullah, M., Aswad, M., Subehan. "Kajian Beberapa Senyawa Antiinflamasi: Docking terhadap Siklooksigenase-2 secara In Silico ." *Majalah Farmasi Indonesia*, 2012: 37-44.