

**SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 70% KULIT JENGKOL
(ARCHIDENDRON JIRINGA (JACK). I.C. NIELSEN) TERHADAP
PENGHAMBATAN SEL KANKER PAYUDARA MCF-7 DAN
KANKER SERVIKS HELA**

Submitted : 28 Januari 2019

Edited : 15 Mei 2019

Accepted : 25 Mei 2019

Harry Noviardi*, Antonius Padua Ratu, Diah Ajeng Tri R

Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor, Jl. Kumbang
No. 23, Bogor, Indonesia.
Email : harry.noviardi@gmail.com

ABSTRACT

Jengkol (Archidendron jiringa (Jack).I.C. Nielsen) skin for this belongs to the organic wastes that do not provide economic value. Compounds of natural ingredients on the Jengkol Skin among others, alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and triterpenoids. Some of the molecular structures of the compound are thought to potentially in inhibiting the growth of cancer cells. This research aimed to determine the cytotoxicity effect of 70% ethanol extract of Jengkol Skin as anticancer. Jengkol Skin was macerated in ethanol 70% then extract was concentrated with a rotary vacuum evaporator and water bath. Cytotoxicity test was carried out using cells MCF-7 (breast cancer) and HeLa cells (cervical cancer) based upon the method of MTT assay. The parameter was the value measured inhibition concentration (IC₅₀). Extracts of the Jengkol Skin showed activity against cytotoxicity MCF-7 cells with IC₅₀ values of 51.76 µg/mL and for the IC₅₀ value of HeLa cells 39.618 µg/mL. IC₅₀ values of the cell were less than 100 µg/mL, indicated categories of potential cytotoxicity. The Jengkol Skin extract could be used as anticancer agents.

Keywords : Cytotoxicity, HeLa, Jengkol Skin, MCF-7, MTT assay.

PENDAHULUAN

Di dunia, kanker merupakan penyebab kematian utama dengan estimasi sebesar 7,6 juta kematian (sekitar 13% seluruh kematian) pada tahun 2016, dan diperkirakan semakin meningkat hingga mencapai 13,1 juta kematian pada tahun 2030⁽¹⁾. Kanker payudara menduduki peringkat pertama kasus kanker pada wanita di seluruh dunia, dengan angka kejadian sebesar 1.676.633⁽²⁾. Sedangkan secara nasional, prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Berdasarkan pada estimasi jumlah

penderita kanker, Jawa Tengah merupakan provinsi dengan estimasi penderita kanker terbanyak, yaitu sekitar 68.638 orang diikuti Jawa Timur dengan estimasi penderita kanker sebanyak 61.230 orang. Kanker tertinggi yang terjadi pada perempuan di Indonesia adalah kanker payudara dan kanker serviks⁽³⁾.

Beberapa cara yang telah banyak dilakukan untuk mengatasi tingginya insiden penyakit kanker payudara dan kanker serviks antara lain dengan pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi hormon atau terapi antibodi monoklonal. Hanya saja obat-obat kemoterapeutik yang ada, memiliki efek

samping dengan merusak sel sehat penderita. Terutama menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat misalnya sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna, folikel rambut dan jaringan limfosit⁽⁴⁾. Selain itu dari segi biaya yang tinggi namun tingkat keberhasilan terapi belum optimal, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji dan menemukan obat baru yang lebih efektif dan selektif. Hal ini yang menjadi tantangan untuk mencari obat yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuh-tumbuhan, dengan harapan dapat menemukan antikanker yang efektif dengan efek samping yang minimal.

Salah satu tanaman yang telah diketahui kadar toksisitasnya adalah kulit jengkol. Kulit Jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack). I.C. Nielsen) selama ini tergolong limbah organik yang berserakan di pasar tradisional dan tidak memberikan nilai ekonomis. Kulit jengkol diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol dan saponin⁽⁵⁾. Flavonoid dalam struktur molekulnya mempunyai aktivitas antioksidan dan berpotensi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker⁽⁶⁾. Berdasarkan pada penelitian⁽⁷⁾, ekstrak metanol dari kulit jengkol bersifat toksik, dengan nilai $LC_{50} = 39,27$ ppm. Metode yang digunakan (*Brine Shrimp Lethality Test*)⁽⁸⁾.

Berdasarkan pada uraian diatas, pada penelitian ini bertujuan menentukan sitotoksitas dari ekstrak etanol 70% kulit jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack). I.C. Nielsen) terhadap penghambatan sel kanker payudara (MCF-7) dan kanker serviks (HeLa) menggunakan metode kolorimetri dengan pewarnaan MTT(3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida). Sel kanker payudara MCF-7 banyak digunakan untuk uji secara *in vitro* karena memiliki bentuk terbaik

dari sel kanker lainnya⁽⁹⁾, karakteristik dari MCF-7 yaitu resisten terhadap agen kemoterapi⁽¹⁰⁾. sedangkan pemilihan kultur sel HeLa pada penelitian ini merupakan *Continuous cell line* ini lebih mudah ditangani, tumbuh lebih cepat, sehingga mampu memproduksi lebih banyak sel⁽¹¹⁾.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, alat gelas, botol cokelat, pisau, blender, ayakan *mesh* 40, kertas saring, *rotary evaporator*, cawan penguap, cawan krus porselen, oven, pH meter, timbangan analitik (ACID AD-300i), *Microplate* 96 well, inkubator CO₂, autoklaf, *biological safety cabinet* II, mikroskop *inverted*, mikro pipet, pipet tips, aluminium foil, *ELISA Reader*.

Bahan pada penelitian ini adalah kulit jengkol (*Archidendron jiringa*) yang telah dideterminasi oleh Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Kultur sel kanker payudara MCF-7 dan HeLa koleksi dari Laboratorium Kultur Sel dan Sitogenetika Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjajaran Bandung. Bahan lain antara lain adalah etanol 70%, reagen fitokimia, RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640, FBS (*fetal bovine serum*), PBS (*phosphate buffered salina*), DMSO (dimetil sulfoksida), Penicilline-streptomisin, Amfoterisin B, Tripsin EDTA 5%, Tripitan Blue Stain 0,4%, MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) dan doxorubicin HCl injeksi.

Ekstraksi Kulit Jengkol.

Kulit jengkol dipanen kemudian dibersihkan dirajang kemudian dikeringkan. Simplisia kering digiling agar memudahkan dan mengoptimalkan proses

ekstraksi. Sebanyak 700 gram serbuk simplisia kulit jengkol, masing-masing dimasukkan pada botol coklat kemudian ditambahkan etanol 70% sampai terendam. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam dan setiap 1x24 jam dilakukan penggantian pelarut untuk menghindari jenuhnya pelarut. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* dan pemekatan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian pada ekstrak kental dilakukan penapisan fitokimia untuk identifikasi senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid/steroid⁽¹²⁾.

Preparasi Sel.

Sel inaktif yang disimpan pada *freezer* suhu -80°C dalam ampul segera dicairkan pada suhu 37°C kemudian disemprot etanol 70%. Ampul dibuka dan suspensi sel diambil sebanyak 1 mL dimasukkan tetes demi tetes pada falcon *tube* yang berisi media kultur sebanyak 3 mL. Suspensi sel disentrifus 1000 rpm selama 5 menit, lalu bagian supernatan dibuang. Pellet ditambahkan 20 mL media kultur dan diresuspensikan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan pada *culture flask*, diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO_2 selama 24 jam (masing-masing sel 1 *culture flask*). Media diganti setiap 2 hari sekali dan sel ditumbuhkan hingga sel 80% konfluen. Selanjutnya media kultur dibuang dan sel dicuci dengan PBS 1x, pada *culture flask* ditambahkan tripsin sebanyak 3 mL untuk melepaskan sel dari matriks, setelah sel sudah lepas semua ditambahkan media kultur untuk menginaktifkan tripsin, karena dalam media kultur terdapat FBS (*fetal bovine serum*) yang dapat menetralkan tripsin. Kepadatan sel dihitung dengan diambil sebanyak 10 μL sel ditambahkan tripan *blue* sebanyak 10 μL kemudian dimasukkan pada

Haemocytometer Nauber dan dilakukan perhitungan di bawah mikroskop inverted sehingga diperoleh kepadatan sel untuk MCF-7 sebesar 40×10^4 sel/mL, jumlah sel yang digunakan pada tiap sumuran adalah 5×10^4 sel/mL, sehingga volume sel yang dipipet sebanyak 12,5 mL ditambahkan media lengkap 7,5 mL. Sedangkan pada sel HeLa sebesar 35×10^4 sel/mL, jumlah sel yang digunakan pada tiap sumuran sama dengan di atas, sehingga volume sel yang dipipet sebanyak 14,3 mL ditambahkan media lengkap 5,7 mL dan masing-masing sel ditransfer ke masing-masing sumuran sebanyak 200 μL dan sel siap diberikan perlakuan.

Penentuan Sitotoksitas dengan Metode MTT.

Sel yang telah ditransfer ke dalam masing-masing sumuran, sel diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO_2 selama 24 jam. Setelah diinkubasi dan sel sudah normal, sel diberikan perlakuan dengan larutan uji 2000 μg kemudian ditambahkan pelarut DMSO 1% dalam media kultur sebanyak 2000 μL sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentrasi 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk perlakuan. Masing-masing konsentrasi dimasukkan pada tiap-tiap sumuran yang sudah ditentukan secara triplo. Selanjutnya diinkubasi kembali suhu 37°C dengan aliran 5% CO_2 selama 48 jam. Pada pengujian ini terdapat beberapa kontrol, yaitu kontrol media, kontrol pelarut DMSO 1% dalam media dan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan, yaitu doxorubicin HCl dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Setelah 48 jam, media kultur dibuang kemudian sel dicuci dengan 100 μL PBS pada tiap-tiap sumuran kemudian ditambahkan reagen MTT 10% dalam

media kultur 100 μL , selanjutnya sel diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO_2 . Sel yang hidup akan bereaksi dengan reagen MTT yang berwarna kuning membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan 100 μL DMSO pada tiap-tiap sumuran. Plat yang telah ditambahkan DMSO diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada tiap sumuran dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Data absorbansi yang diperoleh dikonversi ke dalam persen sel hidup.

Analisis Data.

Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase kematian sel terhadap jumlah sel hidup dalam kontrol sel. Untuk menentukan nilai sitotoksik dilakukan perhitungan nilai IC_{50} yang dihitung menggunakan regresi linier dari perlakuan terhadap persen hidup sel. IC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan kadar yang dapat mematikan 50% jumlah sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Simplisia.

Ekstraksi maserasi dipilih pada proses ekstraksi kulit jengkol karena pengerjaannya yang cukup sederhana dan tidak memerlukan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% karena sifatnya yang polar dan merupakan pelarut universal sehingga diharapkan semua metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kulit jengkol dapat berdifusi ke dalam pelarut. Proses maserasi dilakukan 3x24 jam dan penggantian pelarut tiap 1x24 jam dengan harapan senyawa yang terkandung dapat terlarut semua kedalam pelarut. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* dan pemekatan dengan

waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kulit jengkol yang diperoleh sebanyak 45 gram dari 700 gram serbuk simplisia kulit jengkol yang digunakan.

Berdasarkan pada penapisan fitokimia yang dilakukan, diperoleh hasil pada ekstrak kulit jengkol mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid. Golongan senyawa diatas merupakan senyawa yang diduga dapat digunakan sebagai antikanker.

Sitotoksisitas Ekstrak.

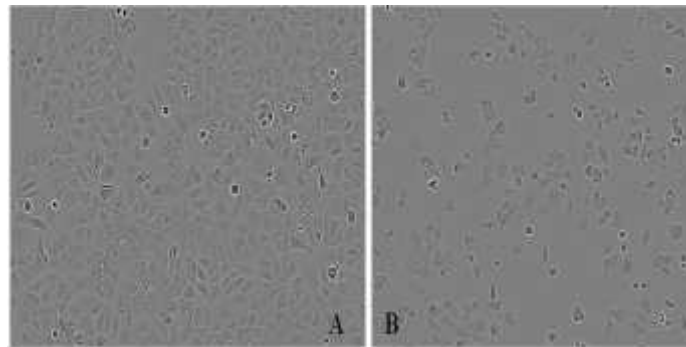
Pada uji sitotoksisitas DMSO 1% sebagai pelarut juga diukur nilai absorbansinya untuk melihat pengaruh DMSO terhadap hasil yang diperoleh. Kadar DMSO kurang dari 3% tidak bersifat toksik atau membunuh sel kanker sehingga dapat digunakan sebagai kontrol pelarut⁽¹³⁾.

Aktivitas sitotoksik sel kanker MCF-7 dan sel HeLa juga dapat diamati secara mikroskopis dengan mikroskop *inverted* untuk melihat morfologi sel MCF-7 dan sel HeLa tanpa pemberian ekstrak dan setelah pemberian ekstrak konsentrasi 800 ppm. Hasil uji tersaji pada Gambar 1 dan Gambar 2.

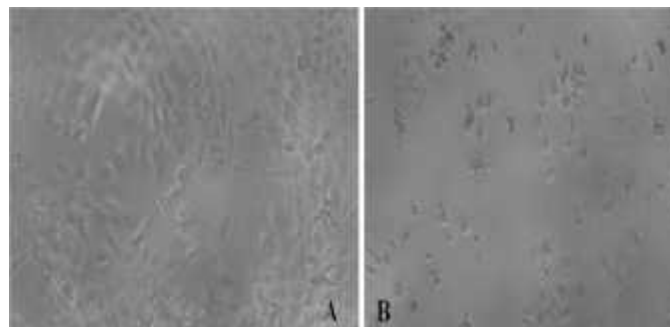
Bedasarkan pada pengujian MTT ekstrak kulit jengkol terhadap sel MCF-7 dan sel HeLa diperoleh data absorbansi yang kemudian digunakan untuk menghitung persen sel hidup. Untuk mengetahui efek sitotoksik dari sampel perlu dilakukan penghitungan IC_{50} dari persentase sel hidup tersebut dibandingkan dengan log konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel kanker sebanyak 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel⁽¹⁴⁾. Dari persamaan tersebut dihitung nilai

inhibition concentration (IC_{50}) dari ekstrak kulit jengkol terhadap penghambatan sel MCF-7 dan sel HeLa. Semakin besar kadar senyawa uji yang diberikan pada suspensi sel, maka semakin kecil persentase sel hidup yang dihasilkan. Nilai IC_{50}

merupakan besarnya konsentrasi suatu yang menimbulkan penghambatan kehidupan dari 50% sel⁽¹⁵⁾. Nilai IC_{50} sel MCF-7 dapat dilihat pada Gambar 3 sedangkan untuk nilai IC_{50} sel HeLa dapat dilihat pada Gambar 4.



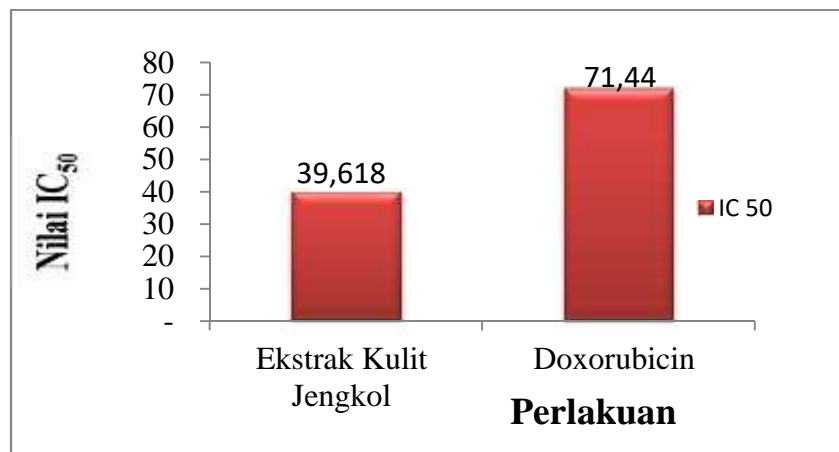
Gambar 1. Perlakuan sel MCF-7 tanpa penambahan ekstrak (A), setelah penambahan ekstrak konsentrasi 800 ppm (B).



Gambar 2. Perlakuan sel HeLa tanpa penambahan ekstrak (A), setelah penambahan ekstrak konsentrasi 800 ppm (B).



Gambar 3. Nilai IC_{50} ekstrak kulit jengkol dan doxorubicin terhadap sel MCF-7.



Gambar 4. Nilai IC₅₀ ekstrak kulit jengkol dan doxorubicin terhadap sel HeLa

Berdasarkan pada data yang disajikan diatas nilai IC₅₀ ekstrak kulit jengkol terhadap sel MCF-7 sebesar 51,76 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial sedangkan nilai IC₅₀ kontrol positif doxorubicin terhadap sel MCF-7 lebih kecil, yaitu 19,39 µg/mL tergolong antikanker. Doxorubicin memiliki nilai IC₅₀ jauh lebih kuat dibandingkan dengan pengaruh ekstrak kulit jengkol terhadap sel MCF-7. Hal tersebut dikarenakan doxorubicin merupakan obat kanker yang telah teruji aktivitasnya dan pengaruh doxorubicin yang lebih sensitif terhadap sel kanker MCF-7⁽¹⁶⁾. Sedangkan nilai IC₅₀ ekstrak kulit jengkol terhadap sel HeLa sebesar 39,618 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial sedangkan nilai IC₅₀ kontrol positif doxorubicin terhadap sel HeLa lebih besar, yaitu 71,44 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial.

Kategori nilai sitotoksitas dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu: (1) sitotoksik potensial jika IC₅₀ < 100 µg/mL, (2) sitotoksik moderat jika 100 µg/mL < IC₅₀ < 1000 µg/mL dan tidak toksik jika IC₅₀ > 1000 µg/mL. kelompok senyawa dengan sitotoksitas potensial dapat digunakan sebagai agen antikanker sedangkan sitotoksitas moderat dapat dimanfaatkan untuk kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat

pertumbuhan sel kanker. *National Cancer Institute* (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong antikanker jika IC₅₀ < 20 µg/mL⁽¹⁷⁾. Berdasarkan pada kategori sitotoksitas tersebut maka ekstrak kulit jengkol dapat digunakan sebagai agen antikanker yang potensial terhadap kultur sel MCF-7 dan sel HeLa. Namun, untuk melihat tingkat selektivitas ekstrak kulit jengkol dalam penghambatan sel maka perlu dilakukan pengujian terhadap sel normal kanker payudara dan kanker serviks.

SIMPULAN

Kandungan senyawa pada ekstrak etanol 70% kulit jengkol berdasarkan pada penapisan fitokimia menunjukkan keberadaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin. Hasil rendemen ekstrak kulit jengkol sebesar 6%. Nilai IC₅₀ ekstrak kulit jengkol terhadap sel MCF-7 sebesar 51,76 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial sedangkan nilai IC₅₀ kontrol positif doxorubicin terhadap sel MCF-7 lebih kecil, yaitu 19,39 µg/mL tergolong antikanker. Nilai IC₅₀ ekstrak kulit jengkol terhadap sel HeLa sebesar 39,618 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial dan nilai IC₅₀ kontrol positif doxorubicin terhadap sel HeLa lebih besar, yaitu 71,44 µg/mL termasuk dalam kategori sitotoksitas potensial. Berdasarkan pada kategori

sitotoksitas tersebut maka ekstrak kulit jengkol dapat digunakan sebagai agen antikanker yang potensial terhadap kultur sel MCF-7 dan sel HeLa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor. Penelitian didanai oleh Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor melalui Hibah Internal Dosen STTIF Tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- [WHO] World Health Organization, 2016, Prevention. Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes: module 2). Geneva: World Health Organization, *Indonesian Journal of Cancer*, 11(1):1-3.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer, 2015, *Globocan 2015: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*, Diakses melalui http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. pada tanggal 5 Mei 2018 jam 11.20 WIB.
- [Kemenkes RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2016, *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*, Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, Hlm 4.
- Tanu, I, 2012, *Antikanker*, Di dalam: Sulistia, G. G., Rianto, S., Nafrialdi, Elysabeth, editor, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Hlm 686-701.
- Syafinir, L., Krishnamurti, Y., Ilma, M., 2014, Uji aktivitas antibiabetes ekstrak etanol kulit jengkol (*Archidendron pauciflorum (Benth) I.C. Nielsen*). *Prosiding SnaPP 2014 Sains, Teknologi, dan Kesehatan*, Bandung: FMIPA, Universitas Islam Bandung, Hlm 67-72.
- Simanjuntak, K., 2012, Peran Antioksidan Flavonoid Dalam Meningkatkan Kesehatan, *Bina Widya*. 23:135-140.
- Lubis, M. Y., Lamek, M., M. Pandapotan, N., Partomuan, S., 2016, Uji Fenolik dan Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Kulit Jengkol (*Archidendron jiringa*). *Chempublish Journal*, 1 (2):42-51.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. dan McLaughlin, J. L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*, 45:31-34.
- Widowati, L. dan Mudahar, H., 2009, Uji aktivitas ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme (lood) bi*) terhadap sel kanker payudara MCF-7 in vitro, [Skripsi], Media Litbang Kesehatan, Hlm 3–8.
- Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S., dan Rahmi, F., 2008, Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu L.*) Mampu Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7, *Majalah Farmasi Indonesia*, 15(1):12-19.
- Anggrianti, P., 2008, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba L.*) Terhadap Sel HeLa, [Skripsi], Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Hlm 20-21.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan* oleh J.B. Harborne, terbitan ke-2. Bandung: Penerbit ITB, Terjemahan dari: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Hlm 24-35.
- Medisusyanti, A.S., Haryoto. 2018. *Aktivitas Sitotoksik Fraksi Polar Umbi Bawang Putih (Allium sativumL.) terhadap Sel T47D*. Surakarta: The 7th University Research Colloquium. Hlm 375-376.
- Son, H.L., Anh, N.P., 2013, Phytochemical composition, in vitro antioxidant and anticancer activities of quercetin from methanol extract of *Asparagus cochinchinensis*, *Academic Journal*, 7(46): 3360-3366.

15. Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A., dan Foekens, J. A, 1995, The MTT Tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*,33:813-823.
16. Putram, N.M., Iriani, S., Kustiariyah, T., Muhammad, N., 2017, Aktivitas Antikanker Dari Fraksi Aktif Teripang. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*,20(1): 53-62.
17. [NCI] National Cancer Institute, 2001. *Measuring Cancer Death*.Diakses: melalui <http://www.cancer.gov/csr>, Pada tanggal 12 Agustus 2018 jam 10:42 WIB.