

# EFEK SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL UMBI BIT (*Beta vulgaris* L. var *rubra* L.) TERHADAP SEL T47D DAN UJI KANDUNGAN KIMIANYA

Sri Susilowati<sup>1)</sup>, Iga Dewinta Putri<sup>1)</sup>, Aqnes Budiarti<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

---

## INTISARI

Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian wanita di berbagai belahan dunia. Berbagai penelitian untuk mendapatkan obat kanker payudara telah banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) terhadap sel T47D yang merupakan sel kanker payudara dan uji kandungan kimianya.

Pembuatan senyawa uji dibuat melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT assay dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml. Pengamatan dilakukan terhadap data absorbansi dari sel hidup yang diperoleh dari pembacaan serapan ELISA. Analisa data dilakukan terhadap persentase kehidupan sel T47D untuk menetapkan nilai IC<sub>50</sub>. Uji kandungan kimia dilakukan melalui proses uji pendahuluan dengan pereaksi kimia dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis. Analisis data uji kandungan kimia dilakukan secara kualitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 253,86 µg/ml. Hasil uji kandungan kimia menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit mengandung flavonoid.

**Kata Kunci** : Sitotoksitas, Fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit, *Beta vulgaris* L. var *rubra* L., Sel T47D

## ABSTRACT

Breast cancer is the prime cause of women death in various parts of the world. Many research to get breast cancer drug has been widely applied. The aims of this study were to determine the cytotoxic effect of ethyl acetate fraction of ethanolic extract of the beet root (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) on T47D cell line which was the breast cancer cell and test their chemical compound.

The extract was made by *macerare* method, and than it was fractionated by using ethyl acetate. Cytotoxicity test using MTT assay method with concentration 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml. Observation was done to get the viability cell absorbance by using ELISA reader. Analytical data carried out toward percentage viability T47D cell line to determine a value IC<sub>50</sub>. The chemical compound tests done through a process of preliminary test with a chemical reagent and thin layer chromatografi. The chemical compound were qualitative analysis.

The result showed that ethyl acetate fraction of ethanolic extract beet roots had cytotoxic effect against T47D cell line with IC<sub>50</sub> 253,86 µg/ml. The chemical compound of the ethyl acetate fraction of ethanolic extract of beet root were flavonoids.

**Keywords**: Ethyl acetate fraction of ethanolic extract of beet roots, *Beta vulgaris* L. var. *rubra* L., Cell line T47D, Flavonoids

## PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan tumor ganas yang tumbuh dalam jaringan payudara. Kanker bisa tumbuh di dalam kelenjar susu, saluran susu, jaringan lemak maupun jaringan ikat pada payudara (Dowsett, 2008). Pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi dengan hormon atau dengan terapi antibodi monoklonal merupakan cara pengobatan kanker yang selama ini telah dilakukan (Mihajlovic, 2008; Dolinsky, 2002). Pengobatan yang telah ada tersebut tidak selalu berhasil dan cenderung menimbulkan efek samping toksik pada jaringan normal serta resistensi sel kanker (Tyagi et al., 2004; Davis et al., 2003).

Pengobatan kanker yang sering dilakukan belum dapat mengatasi kanker secara optimal, terutama pada kanker yang telah menyebar ke bagian tubuh lainnya. Selain itu, dampak negatif dari pengobatan kanker memiliki efek samping yang merugikan seperti mual, muntah dan

kerontokan rambut, sehingga diperlukan penelusuran obat anti kanker yang lebih menguntungkan. Eksplorasi tanaman obat merupakan usaha pengembangan alternatif pengobatan kanker untuk menghindari efek samping dari berbagai cara pengobatan yang telah ada.

Umbi bit (*Beta vulgaris* L. var *rubra* L.) mempunyai kandungan betasianin dan betasantin yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antikanker (Escribano et al, 1998; Kapadia et al, 1996; Winkler et al, 2005). Kapadia et al menyebutkan bahwa *Beta vulgaris* var. *rubra* memiliki efek penghambatan secara signifikan pada terjadinya kanker kulit dan kanker paru-paru. Sejauh ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai aktivitas antikanker umbi bit secara spesifik pada kanker payudara sehingga perlu dilakukan penelitian uji sitotoksitas fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit terhadap sel kanker payudara (*cell line* T47D).

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Umbi bit (Getasan, Kab.Semarang), etanol dan etil asetat, Sel T47D (*Cancer Chemoprevention Research Center* UGM), medium RPMI 1640, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIBCO) – 0,5% fungison – 2% antibiotik penisilin dan streptomisin (GIPCO), DMSO (E.Merck), tripsin (Sigma), *Phospat Buffered Saline* (PBS) (Sigma), larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) 5 mg/mL PBS, larutan *sodium dodecyl sulphat* (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, doksorubisin, serbuk Zn, HCl pekat, serbuk Mg, kloroform, pereaksi Mayer, selulosa, etil asetat, asam formiat, asam asetat, aquadest, metanol, amonia, rutin, dragendroff.

### Alat

*Tissue culture flask* (Nunclon), *Laminar Air Flow Cabinet* (Gelman Sciences), sentrifugator (Sarvall MC12V), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), CO<sub>2</sub> *Incubator* (Heraeus), pipet pasteur steril, mikropipet (Gilson), *white tip* steril, *conical tube* (Nunclon), *haemocytometer* (Neubauer), *counter*, kamera digital (Canon Power Shoot A80,4,0 mega pixels).

timbangan elektrik (Sartorius), *96-well plate* (Nunclon), *yellow tip* dan *blue tip*, ELISA *reader* (SLT 240 ATC), blender (Maspijon), ayakan mesh 40, alat-alat gelas, *thermostatic waterbath* (Memmert), viskosimeter (Rion VT-04E), *Moisture Balance* (Ohaus), bejana kromatografi, pipa kapiler, alat penampak bercak, lampu UV 254 nm dan lampu UV 366 nm.

### Jalannya Penelitian

#### Pembuatan Senyawa Uji

Senyawa uji berupa fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dari bahan simpisia umbi bit. Fraksinasi terhadap ekstrak etanol dilakukan berulang kali hingga jernih dengan menggunakan pelarut etil asetat, kemudian pelarut diuapkan hingga diperoleh fraksi kental.

#### Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT *assay*. Suspensi sel T47D dalam medium PRF RPMI 1640 sebanyak 100 µl (kepadatan 1,5 x 10<sup>4</sup> sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%. Kemudian ditambahkan larutan senyawa uji dengan seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25

µg/ml (sebanyak 3 replikasi) selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 100 µl medium baru dan 10 µl MTT 0,5% dalam PBS. *Plate*

#### Uji Kandungan Senyawa Kimia

Uji kandungan senyawa kimia dilakukan hanya terhadap senyawa flavonoid yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik, yaitu melalui uji pendahuluan dengan pereaksi kimia kemudian dilanjutkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada uji pendahuluan pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara fraksi uji ditambah 2 ml etanol 95% ditambah serbuk Mg dan 2 ml HCl 2N dan didiamkan selama 1 menit kemudian ditambah dengan HCl dan terbentuk warna merah dalam waktu 2-5 menit. Terbentuknya warna merah menandakan adanya flavonoid dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit (Depkes RI, 1995). Uji KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit

diinkubasi lagi selama 2,5 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* gelombang 595 nm (CCRC, 2010). setelah uji pendahuluan, yaitu flavonoid. Fase diam yang dipakai adalah Selulosa, dengan fase gerak Etil Asetat–Asam Formiat–Asam Asetat–Air(100-11-11-27), dan reagen untuk deteksi bercak adalah Uap Amonia.

#### Analisis Data

##### Uji Sitotoksitas

Data yang didapat dari hasil pembacaan ELISA *reader* berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversikan dalam persentase kehidupan sel.

Data persentase kehidupan sel T47D ini digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> yang merupakan potensi ketoksikan fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit menggunakan program SPSS 16 *for windows* melalui analisis probit

$$\text{Persentase kehidupan sel} : \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

#### Analisis Kandungan Kimia

Analisis dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan warna bercak yang timbul pada KLT dengan yang terdapat

pada literatur. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV  $\lambda_{254}$ , UV  $\lambda_{366}$  dan pereaksi semprot.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Ekstrak etanol umbi bit hasil ekstraksi adalah 79,34 gram dengan rendemen sebesar 7,96 % dan viskositas sebesar 70 cPas. Ekstrak etanol umbi bit berwarna kemerahan dan baunya wangi seperti gula. Fraksi kental yang didapatkan sebesar 2,1162 gram dengan rendemen 6,02%, dan kekentalan sebesar 30 cPas. Fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit berwarna coklat kekuningan dan baunya wangi seperti gula. Rendemen yang diperoleh sangat kecil karena adanya zat-zat lain yang memiliki polaritas yang berbeda dengan etanol sehingga tidak ikut tersari. Dalam penelitian ini digunakan metode

maserasi karena aman untuk ekstraksi dan terhindar dari proses pemanasan sehingga tidak merusak senyawa yang terkandung dalam umbi bit, kekurangan maserasi yaitu pengerjaan lama dan penyarian kurang sempurna. Proses fraksinasi bertujuan untuk mendapatkan zat yang lebih spesifik, dan senyawa-senyawa pengganggu lebih sedikit sehingga dapat memberikan efek sitotoksik yang lebih besar.

#### Hasil uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit terhadap sel T47D

Perlakuan senyawa uji fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit pada *cell line* T47D dapat menginduksi kematian sel dan berpengaruh terhadap morfologi sel.

Sel yang hidup tampak berbentuk memanjang seperti daun sedangkan sel yang mati tampak berbentuk bulat (Gambar 1). Uji sitotoksik bertujuan untuk mengetahui potensi ketoksikan suatu senyawa yang dinyatakan dalam parameter  $IC_{50}$ .

Pengaruh fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit terhadap *cell line* T47D menunjukkan adanya fenomena *dose dependent*. Semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit yang diberikan maka semakin kecil persentase kehidupan sel T47D dan semakin besar sifat sitotoksitasnya (Tabel I.). Berdasarkan data persentase kehidupan sel T47D akibat perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 253,861  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel II.). Grafik hubungan antara konsentrasi fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit dengan nilai probit dapat dilihat pada gambar 2. Suatu ekstrak poten jika memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 20  $\mu\text{g/ml}$  (Skehan et al., 1990). Berdasarkan standar tersebut maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit memiliki efek sitotoksik terhadap *cell line* T47D tetapi potensi sitotoksiknya kecil.

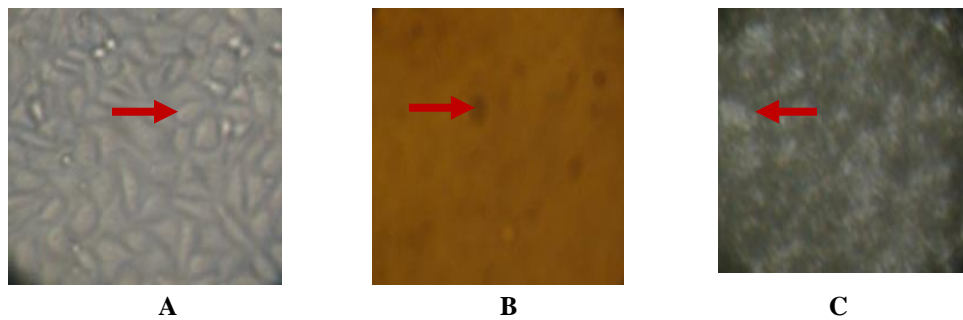
#### **Uji Kandungan Kimia dari fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit**

##### **1. Uji Pendahuluan**

Untuk dapat mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi uji maka dilakukan uji pendahuluan secara kualitatif. Pengujian dilakukan terhadap golongan senyawa flavonoid, saponin dan alkaloid. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel III. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit positif mengandung senyawa golongan flavonoid yang ditunjukkan terbentuknya warna merah pada penambahan serbuk Zn dan Mg.

##### **2. Kromatografi Lapis Tipis**

Penegasan terhadap hasil identifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit dilakukan uji kromatografi lapis tipis, dalam hal ini adalah flavonoid. Identifikasi flavonoid menggunakan fase diam *cellulose* dan fase gerak etil asetat–asam formiat–asam asetat–air (100-11-11-27). Pereaksi dan pembandingnya menggunakan uap amoniak dan rutin. Hasil pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 254 nm, sinar UV 365 nm dan secara visibel. Pada pengamatan secara visibel, bercak sampel positif mengandung flavonoid, dengan ditandai adanya bercak berwarna kuning. Munculnya warna kuning ini disebabkan oleh pembentukan garam dan terbentuknya struktur kuinoid cincin B pada flavonoid karena adanya uap ammonia yang bersifat basa. Beberapa glikosida salah satunya flavonoid dalam larutan netral atau asam tidak berwarna, tetapi akan menjadi kuning terang atau jingga dalam larutan atau suasana basa (Robinson, 1995). Bercak pada visibel berwarna kuning dengan nilai *retardation factor* (*Rf*) sebesar 0,95. Nilai *retardation factor* yang tinggi ini menunjukkan bahwa kelarutan sampel pada fase gerak sangat tinggi sehingga terbawa sampai mendekati batas elusi. Kelarutan sampel pada fase gerak yang tinggi dimungkinkan oleh adanya etil asetat dengan jumlah yang besar pada fase gerak. Nilai *retardation factor* lebih rendah jika pelarut yang digunakan dalam fraksinasi tidak digunakan sebagai fase gerak. Sehingga uji KLT yang dilakukan membuktikan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit mengandung flavonoid, yang dapat dilihat pada (Gambar 3). Senyawa-senyawa flavonoid memiliki aktifitas antioksidan, penghambatan topoisomerase, aktivitas antimetosis dan penghambatan estrogen sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Huryan dan Wipf, 2007).



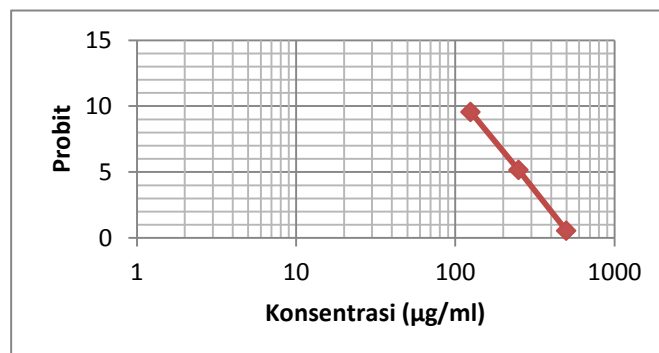
**Gambar 1. Efek sitotoksik Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Umbi Bit terhadap *Cell Line* T47D.**  
 Keterangan: A. Kontrol sel T47D.  
 B. *Cell Line* T47D pada perlakuan dengan doxorubisin dosis 100 µg/ml  
 C. Perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit dengan konsentrasi 250 µg/ml terhadap *cell line* T47D

**Tabel I. Hasil Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Umbi bit terhadap Sel T47D.**

Konsentrasi senyawa uji (µg/ml)	Persentase Kehidupan Sel T47D (%)
500	10,109
250	38,714
125	116,771
62,5	115,047
31,25	119,200

**Tabel II. Data Konsentrasi Senyawa Uji dan Nilai Probit**

Konsentrasi senyawa uji (µg/ml)	Probit	IC <sub>50</sub>
500	0,54	253,861 µg/ml
250	5,15	
125	9,54	



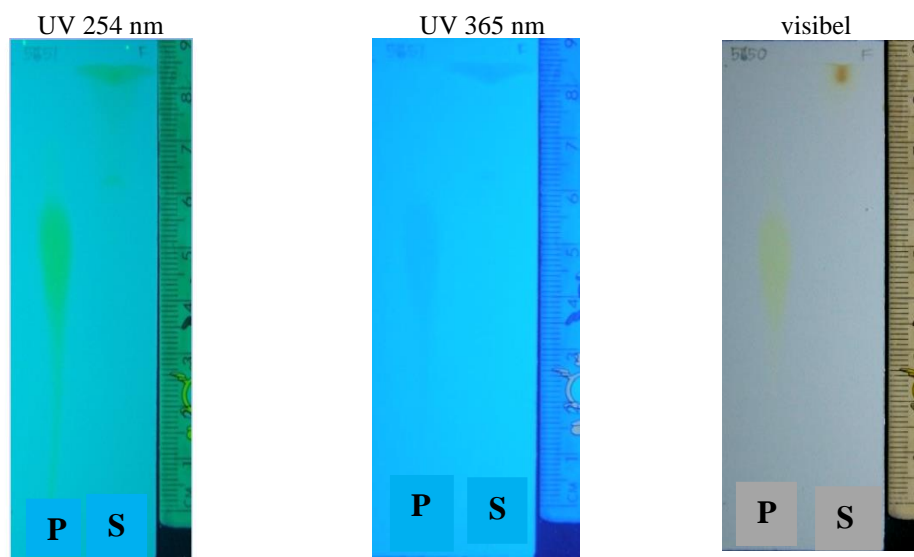
**Gambar 2. Grafik Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit (µ/ml) vs Probit**

Uji aktivitas antikanker terhadap sel murine leukemia P388 dari senyawa flavonoid hasil isolasi menunjukkan aktivitas yang mencolok dengan nilai  $IC_{50}$  2,4  $\mu$ g/ml. Nilai ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid sangat aktif sebagai antikanker (Fitrya dan Anwar, 2009). Hasil penelitian lain menunjukkan pada dosis 2,44 mg/0,2 ml, isolat flavonoid herba benalu mangga (*Dendrothoe petandra*)

mampu menghambat pertumbuhan kanker pada mencit (Sukardiman et al., 1999). Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan aktivitas antikanker dari flavonoid. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat ekstrak etanol umbi bit adalah flavonoid. Maka efek sitotoksitas fraksi uji terhadap sel T47D disebabkan oleh adanya flavonoid.

**Tabel III. Hasil Uji Pendahuluan Terhadap Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Umbi Bit**

Golongan Senyawa	Pengujian	Hasil
Flavonoid	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Fraksi uji+serbuk Zn+HCl</li> <li>➢ Fraksi uji+serbukMg+HCl</li> </ul>	Terjadi perubahan warna merah (positif)
Saponin	Fraksi uji digojog selama 30 detik + HCl	Tidak ada buih > 3 cm (negatif)
Alkaloid	Fraksi uji + campuran eter dan kloroform + pereaksi mayer	Tidak ada endapan (negatif)



**Gambar 3. Kromatogram Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol Umbi Bit (S) Dibandingkan Dengan Baku Pembanding Rutin (P)**

**Keterangan :** Fase Diam : Selulosa  
 Fase Gerak : Etil Asetat–Asam Formiat–Asam Asetat–Air  
 P : Pembanding Rutin,  
 S : Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Umbi Bit

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### Kesimpulan

1. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit memiliki efek sitotoksik terhadap *cell line* T47D dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 253,861  $\mu$ g/ml.
2. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit mengandung senyawa golongan flavonoid.

#### Saran

1. Perlu dilakukan isolasi senyawa aktif yang terkandung dalam umbi bit yang berefek sitotoksik.
2. Perlu dilakukan uji sitotoksitas terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak etanol umbi bit secara *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., and Speirs, V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Research*: Vol 5(2): 89-95.
- CCRC, 2010, *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Davis, J.M., Navolonic, P.M., Weinstein, C.R., Steelman, L.S., Hu, Konovlepa, M., Blagosklonny M.V and McCubrey, J.A., 2003, Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct Comomn Pathway That Contribute to Cancer Drug Resistance, *Clinical Cancer Research*, **9**:1161-1170.
- Depkes RI, 1995, *Materia Medika Indonesia*, jilid keenam, Jakarta, 336-337.
- Dolinsky, C., 2002, Breast Cancer: The Basics, <http://www.onkolonk.org/types/article.cfm?c=3&s=5&ss=33&id=8320>, diakses 15 Mei 2010.
- Dowsett, M., 2008, Introduction to Sessions on 'Predicting personal risk for breastcancer, *Breast Cancer Research*, **10**, London, UK.
- Escribano, J., Pedreno, M.A., Carmona, F.G., Munoz, R., 1998, Characterization Of The Antiradical Activity Of Betalains From *Beta vulgaris* L. roots, *Phytochemical Analysis*: Vol 9(3): 124-127.
- Fitrya dan Anwar, L., 2009, Uji Aktivitas Antikanker Secara In Vitro dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helmynthostachis Zeylanica* (Linn) Hook), *Jurnal Penelitian Sains* : **12**.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2008, *Kimia Farmasi Analisis*, Cetakan III, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 353-355.
- Huryn, D.M., Wipf, P., 2007, Natural Product Chemistry and Anticancer Drug Discovery, dalam Neidle, S., *Cancer Drug Design and Discovery*, AP, London, 110-111.
- Kapadia, G.J., Tokuda, T., Konoshima and Nishino, H., 1996, Chemoprevention of Lung and Skin Cancer by *Beta vulgaris* (Beet) Root Extract. *Cancer Lett.*, **100**: 211-214.
- Mihajlovic M. L., 2008, Recent Advances in Radiation Therapy of Cancer Cells: A Step towards an Experimental dan Systems Biology Framework, Current Radiopharmaceuticals, *Bentham Science Publishers Ltd.*, **1**:22-29, Yugoslavia.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth & Survival: Application to Proliferation & Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Method* : **65** (1-2):55-63.
- Nafrialdi, dan Ganiswarna, S., 2007, Antikanker , dalam Ganiswara, S., Setiabudy R., Suyatna, F.D., Purwastyastuti, Nafrialdi (eds), *Farmakologi dan Terapi*, edisi ke-5, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran UI, Jakarta : 732.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, edisi keenam, Penerbit ITB, Bandung, 209.
- Schick, Y.K., 2009, Beet, <http://en.wikipedia.org/wiki/Beet>, diakses 11 Januari 2010
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *Journal of The National Cancer Institute*, **82**(13):1107-1112
- Sukardiman, Santa, I. G. P., and Rahmadany, 1999, Efek Anti Kanker Isolat Flavonoid dari Benalu Mangga (*Dendrophthoe petandra*), *Cermin Dunia Kedokteran*, **122** : 7-8.
- Tyagi, A.K., Agarwal, C., Chan, D.C.F dan Agarwal, R., 2004, Synergistic Anti Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin dan Carboplatin against Human Breast Carcinoma MCF-7 dan MDA-MB468 Cells, *Oncology Reports*, **11**:493-499.
- Weinberg, R.A., 1996, How Cancer Arises, *Scientific American* : Vol 18 : 62-70.
- Winkler, C., Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Schennach, H., and Fuchs, D., 2005, In vitro Effects of Beet Root Juice on Stimulated and Unstimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**:4.

