

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL 50% DAUN KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.) Presl.)
TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*Ca Ski Cell Line*) SECARA *IN-VITRO***

***IN-VITRO* CYTOTOXIC ASSAY 50% ETHANOL EXTRACT KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.)
Presl.) LEAF AGAINST CERVICAL CANCER CELLS (*Ca Ski Cell Line*)**

Aprilita Rina Yanti Eff

Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul

Naskah diterima tanggal 22 Februari 2016

ABSTRACT

Kitolod (Isotoma longiflora (L.) Presl.) is a traditional medicinal plant which is efficacious as anticancer. Empirically kitolod had been used by Indonesian people for the treatment of cancer, but this remains to be proven scientifically through research. The objective of this research was to determine the cytotoxic activity of 50% Ethanol Extract of Kitolod leaves at concentration of 25 µg / mL, 50 µg / mL, 75 µg / mL, and 125 µg/mL ont cervical cancer cells (Ca Ski Cell Line) in vitro assay using red natural methods. Results of Cytotoxic assay showed that IC₅₀ values 50% Ethanol Extract of Kitolod leaves in Ca Ski Cell Line was 55.78 ug/mL. Ethanol extract at concentration of 25 µg / mL, 50 µg / mL, 75 µg/mL, and 125 µg / mL have cytotoxic effecst on cervical cancer cells (Ca Ski Cell Line) and extract at concentration of 125 ug / mL indicates the largest percentage of cell death.

key words : Kitolod (Isotoma longiflora (L.) Presl.), cytotoxic, Ca Ski Cell line, natural red

ABSTRAK

Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang berkhasiat sebagai antikanker. Secara empiris kitolod telah digunakan sebagian masyarakat Indonesia untuk pengobatan penyakit kanker, namun masih perlu dibuktikan secara ilmiah melalui suatu penelitian. Tujuan dari penelitan ini adalah mengetahui aktivitas sitotoksik dari Ekstrak Etanol 50% Daun Kitolod pada konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, dan 125 µg/m terhadap sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) secara in-vitro menggunakan metode *natural red assay*. Hasil uji sitotoksik ekstrak etanol 50% daun kitolod pada sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 55,78 µg/ml. Ekstrak etanol 50% daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) pada konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, dan 125 µg/ml mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) dan Ekstrak etanol 50% daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) pada konsentrasi 125 µg/ml menunjukkan persentase kematian sel Ca Ski yang paling besar, yaitu 72,68%.

Kata kunci : Kitolod (Isotoma longiflora (L.) Presl.), siotoksik, Ca Ski Cell line, natural red

Alamat korespondensi :

Email: aprilita.rinayanti@esaunggul.ac.id

PENDAHULUAN

Kanker serviks atau karsinoma serviks merupakan jenis kanker kedua terbanyak pada wanita di seluruh dunia setelah kanker payudara. Penyakit kanker serviks dan payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013, yaitu kanker serviks sebesar 0,8% dan kanker payudara sebesar 0,5%. Provinsi Kepulauan Riau, Provinsi Maluku Utara, dan Provinsi D.I. Yogyakarta memiliki prevalensi kanker serviks tertinggi yaitu sebesar 1,5 (Departemen Kesehatan, 2015). Kanker leher rahim (kanker serviks) adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim/serviks (bagian terendah dari rahim yang menempel pada puncak vagina). Kanker ini umumnya tidak tampak, tetapi dapat dirasakan oleh penderitanya. Kanker serviks biasanya menyerang pada wanita yang berusia antara 25-34 tahun dengan puncaknya pada usia 45-54 tahun (American Cancer Society, 2001; Bruni *et al.*, 2016).

Penyebab kanker serviks yang umum diketahui disebabkan oleh *Human Papiloma Virus* (HPV). Pengobatan kanker (khususnya kanker serviks) secara medis yang biasa dilakukan selama ini adalah dengan terapi pembedahan, penyinaran dan terapi kimia menggunakan sitostatika (WHO, 2013). Tetapi masyarakat banyak yang tidak mau melakukan pengobatan secara medis karena alasan-alasan tertentu seperti alasan psikologis, ekonomi, adanya efek samping, serta karena tidak adanya jaminan kesembuhan. Penemuan tanaman-tanaman obat yang menunjukkan efek farmakologis terhadap penyakit kanker terutama yang telah mengalami uji secara ilmiah telah memberikan alternatif dalam mengatasi dan mengobati penyakit kanker. Salah satu potensi keanekaragaman flora di Indonesia yaitu sebagai sumber obat. Tanaman obat merupakan tanaman yang digunakan untuk menjaga kesehatan dan menyembuhkan penyakit pemakainya. Bagian yang biasanya digunakan untuk obat dapat berasal dari rimpang, akar, kulit, buah, bunga, biji, daun ataupun batangnya (Witantri, 2015).

Kitolod merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang berkhasiat sebagai antikanker. Kitolod merupakan tumbuhan semusim, tegak, tinggi sekitar 50 cm, bercabang dari pangkalnya, berambut, bergetah warna putih yang rasanya tajam dan beracun. Kitolod sangat kaya kandungan kimia. Kandungan kimia yang sudah dikenal antara lain senyawa alkaloid, yakni lobelin, lobelamin, dan isotomin.

Daunnya mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol. Secara empiris kitolod telah digunakan sebagian masyarakat Indonesia untuk pengobatan terhadap penyakit antikanker atau antineoplastik, antiinflamasi atau antiperadangan, asma, analgesik atau penghilang rasa nyeri, hemostatik atau menghentikan pendarahan, dan mengatasi gangguan pada mata (Ali, 2006; Dalimartha, 2004). Namun hal ini, masih perlu dibuktikan secara ilmiah melalui suatu penelitian. Salah satu tahapan awal untuk menilai aktivitas kitolod sebagai antikanker adalah melalui bioasai.

Bioasai merupakan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas dari suatu tumbuhan atau zat yang berasal dari tumbuhan. Bioasai zat sitotoksik pada tumbuhan dapat dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Secara *in vivo* menggunakan hewan coba yaitu mencit yang telah diinokulasi dengan sel kanker, sedangkan secara *in vitro* menggunakan sel kanker tikus atau manusia dalam biakan sel. Aktivitas antikanker dinyatakan dengan menentukan LC_{50} dari zat aktif murni atau ekstrak yang berasal dari tumbuhan. Menurut *National Cancer Institute* (NCI), ekstrak yang mempunyai $LC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ dan zat aktif murni yang nilai $LC_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$, maka dinyatakan aktif sebagai antikanker dan potensial untuk diteliti lebih lanjut (Colegate dan Molyneux, 1993).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik Ekstrak Etanol 50% Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) terhadap sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) secara *in-vitro*.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Tissue culture flask (Nunclon), tips pipet kuning, tips pipet biru, plate 96 well (Nunclon), pipet serologik glass 10 ml (Falcon), pipet serologik glass 5 ml (Falcon), autoklaf, *Laminar Air Flow Biological safety Cabinet* (Forma Scientific), timbangan elektrik (Satorius), penangas air (medin), inkubator CO_2 (Forma Scientific), alat sentrifus (Porta Centrifuge), tube sentrifuse (Falcon), penyaring berpori dengan diameter $0,2 \mu\text{m}$ steril (Nalgene), tangki nitrogen cair (Locator JR Thermolyne), mikroskop (Nikon TMS), kaca objek hitung sel (Hemasitometer), pipet Eppendorf kuning, pipet Eppendorf biru, pendingin balik, vakum *rotary evaporator*, *ELISA plate Reader*.

Bahan

Ekstrak etanol 50% dari Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) dengan berbagai konsentrasi, sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*), pelarut *dimetil sulfoksid* (DMSO) (Sigma),

medium kultur *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (Sigma), HEPES (Flow Lab, Sydney, Australia), *Fetal Calf Serum* (FCS), dinatrium hydrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium bikarbonat (NaHCO_3), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), natrium klorida (NaCl), trypan blue, tripsin, *natrium dodesil sulfat* (SDS), *natural red*, etanol 70%, Aquadest.

Metode

1. Pembuatan Ekstrak Etanol 50% Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl)

Sejumlah 301,003 gram Daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) yang telah dideterminasi diserbuk dan diekstraksi dengan cara refluks menggunakan pelarut etanol 50% hingga jernih. Ekstrak etanol yang diperoleh disaring, kemudian dipekatkan dengan bantuan vakum *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Nilai rendemen ekstrak dihitung dengan membagi berat hasil ekstraksi (ekstrak kental) dengan berat awal simplisia. Dari perhitungan rendemen dapat diketahui nilai kesetaraan tiap gram ekstrak kental dengan simplisia (Departemen Kesehatan RI, 2000).

2. Pemeriksaan Kandungan Kimia Ekstrak

Meliputi pemeriksaan kandungan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan steroid-triterpenoid,

3. Pembuatan Konsentrasi larutan uji

Sebanyak 10 mg ekstrak kental etanol daun kitolod ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml DMSO, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 10 mg/ml \sim 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ digunakan sebagai stok I. Sampel uji kemudian diambil 100 μl dari stok I dan ditambah 900 μl RPMI 1640, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 1 mg/ml \sim 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) digunakan sebagai stok II. Dari larutan stok II dibuat konsentrasi larutan uji yaitu 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4. Persiapan Kultur Sel

Sel yang disimpan dalam nitrogen cair dibenamkan dalam es selama beberapa saat, kemudian pindahkan ke suhu ruangan hingga mencair. Cairan sel sebanyak 1 ml diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan ditambahkan 5 ml medium kultur (RPMI 1640) kemudian suspensi sel di sentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Sel akan mengendap di bawah tabung lalu mediumnya dibuang dan diganti dengan medium kultur (RPMI 1640) dan FCS 20% hingga 6 ml. Sel dimasukkan ke dalam *flask* dan di inkubasi pada

suhu 37°C dalam inkubator CO_2 selama 1 hari (Freshney, 1994).

Sel yang telah *dithawing* selama 1 hari dicuci sebanyak 3 kali dengan 10 ml PBS. Tuang cairan sel dalam *flask*, setelah itu tambahkan 3 ml PBS dan 1 ml tripsin, kemudian diinkubasi selama 5 menit di inkubator CO_2 . Setelah 5 menit dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat lagi pada dinding *flask*, kemudian tambahkan 1 ml medium kultur (RPMI 1640). Setelah itu cairan dikeluarkan dari dalam *flask* dan dimasukkan ke dalam tube sentrifuse kemudian disuspensikan. Selanjutnya suspensi sel disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Sel akan mengendap di bawah tabung lalu mediumnya dibuang dan diganti dengan medium kultur (RPMI 1640) dan FCS 10% hingga 6 ml. Suspensi sel dibagi dua bagian, kemudian dimasukkan ke dalam dua *flask* baru dan diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 (Freshney, 1994).

Sel yang telah di kultur 2-3 hari dikeluarkan, dan dihitung kepadatannya menggunakan mikroskop kemudian diamati di bawah mikroskop (jika kepadatan sel baik maka dapat digunakan, sedangkan jika tidak maka diinkubasi lagi hingga optimal). Setelah itu sel dihitung dengan menggunakan *hemasitometer* untuk melihat sel yang hidup dengan menamnbahkan sebanyak 100 μl sel Ca Ski dengan 900 μl *trypan blue*.

Untuk keperluan bioassay sel diencerkan dengan medium RPMI 1640 dan ditambahkan FCS 10% sampai jumlah sel menjadi 30.000 sel/ml.

5. Bioasai Sitotoksik Sel Ca Ski

Sebanyak 100 μl Suspensi sel Ca Ski dimasukkan ke dalam masing-masing *well*. Kemudian sebanyak 100 μl larutan uji dimasukkan sesuai dengan konsentrasi yang digunakan ke dalam tiap-tiap *well* yang sudah berisi sel Ca ski. *Well* yang diberi larutan DMSO berlaku sebagai kontrol negatif. Setelah selesai perlakuan, segera dimasukkan ke dalam inkubator CO_2 selama 24 jam pada suhu 37°C dan ditambahkan 100 μl *natural red* pada masing-masing *well*, kemudian diinkubasi lagi selama 2 jam. Setelah itu medium kultur dituang dan *well* dicuci dengan PBS dan selanjutnya ditambahkan 300 μl SDS dan diinkubasi selama 30 menit. Persentase kematian sel diukur pada panjang gelombang 495 – 630 nm dengan menggunakan ELISA *Plate Reader*.

$$\% \text{ Kematian Sel} = \frac{\text{Serapan kontrol negatif} - \text{Serapan sampel uji} \times 100\%}{\text{Serapan kontrol negatif}} \dots\dots(1)$$

Persentase kematian sel untuk tiap konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus (1)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi di Herbarium Bogoriense, Bogor menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) dari suku Campanulaceae.

Hasil pemeriksaan kandungan kimia menunjukkan ekstrak etanol 50% Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid-triterpenoid. Ekstrak memiliki nilai rendemen sebesar 5,43%.

Hasil perhitungan kematian sel Ca Ski yang diberi ekstrak etanol 50% daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) berdasarkan rumus 1 dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan perhitungan data kematian sel selanjutnya dibuat grafik hubungan linier antara konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dengan persentase kematian sel (%) yang ditunjukkan pada gambar 1 dan diperoleh persamaan regresi $y = 27,354 + 0,406 x$. Dari persamaan regresi linier dapat dihitung nilai LC_{50} sebesar 55,78 $\mu\text{g/ml}$) dan koefisien korelasi sebesar 0,905 menunjukkan bahwa ada hubungan yang sangat erat antara konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dengan dengan persentase kematian sel.

Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) secara empiris berkhasiat sebagai obat antikanker atau antineoplastik, antiinflamasi atau antiperadangan, asma, analgesik atau penghilang rasa nyeri, hemostatik atau menghentikan pendarahan, dan mengatasi gangguan pada mata (Ali, 2006; Anonim, 2007; Dalimartha, 2004).

Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) mengandung senyawa kimia antara lain alkaloid, yakni lobelin, lobelamin, dan isotomin. Daunnya mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Ali, 2006; Anonim, 2015; Dalimartha, 2004). Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstra ketanol daun kitolod mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid-

triterpenoid. Beberapa senyawa kimia dari bahan alam terbukti memiliki efek antikanker, seperti senyawa alkaloid bekerja sebagai antikanker dengan cara menginduksi apoptosis, menurunkan adhesi sel dan menghambat angiogenesis secara selektif. Steroid dapat menginduksi apoptosis dan meningkatkan densitas matrik mitokondria, triterpenoid menginduksi apoptosis dan saponin dapat menghambat angiogenesis dan reseptor tirosin kinase (Bhanot, et al, 2011)

Pada penelitian ini tidak menggunakan kontrol positif karena dengan pengujian secara *in vitro* merupakan skrining awal untuk mengetahui zat antikanker. Dengan demikian jika terjadi penurunan jumlah pertumbuhan sel kanker serviks (*Ca Ski Cell Line*) dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas sebagai antikanker (Mulyani, 2005).

Pengembangan obat baru untuk penyakit kanker melibatkan evaluasi preklinik senyawa kimia untuk membuktikan aktivitas antineoplastik. Pengujian sitotoksik secara *in vitro* dengan menggunakan sel turunan dapat digunakan sebagai skrining awal untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang bersifat sitotoksik. Pengujian secara *in vitro* ini lebih mudah dan murah jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo*. Selain itu pengujian secara *in vitro* dengan menggunakan sel turunan manusia (*human cell line*) dapat mengatasi masalah dari keterbatasan model hewan yang digunakan secara *in vivo* yang berkaitan dengan perbedaan metabolisme hewan tersebut dengan manusia (Freshney, 1994).

Kultur jaringan dengan metode *in vitro* merupakan alternatif terbaik untuk mempelajari mekanisme pembentukan sel kanker maupun mekanisme aksi bahan obat terhadap sel sasaran (Ravi *et al.*, 2014). Sel Ca Ski (*Ca Ski Cell Line*) berasal dari penderita kanker serviks yang mengandung virus papiloma manusia tipe 16 (HPV 16) dan diambil dari tempat metastasis kanker serviks, yaitu pada daerah epidermoid (Magaldi, 2012).

Tabel 1. Persentase kematian sel Sel Ca Ski dari Ekstrak Etanol 50% Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) pada 24 Jam inkubasi

	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)			
	25%	50%	75%	125%
	32.6	45.98	69.53	72.49
	32.2	47.28	69.71	72.54
	32.45	46.63	69.4	73
Rata-rata	32.41	46.63	69.55	72.68
SD	0.202	0.65	0.16	0.28

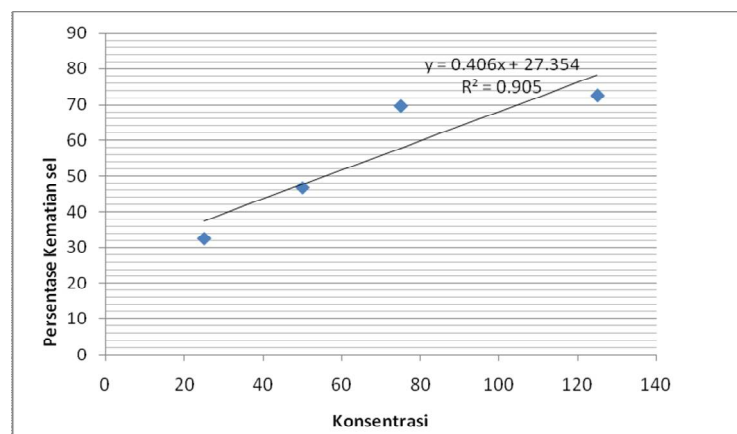
Uji sitotoksik *natural red* adalah berdasarkan penggabungan pewarna *natural red* dengan lisosom sel yang hidup setelah diinkubasi dengan bahan kimia yang toksik. Sitotoksik suatu zat yang kita tambahkan pada kultur sel dan diinkubasi mengubah keseimbangan permukaan sel atau pada membran sel yang sensitif misalnya lisosom dan perubahan yang disebabkan aktivitas xenobiotik dengan memusnahkan plasma atau membran lisosom. Sifat uji metode ini adalah memantau sel yang masih hidup. *Natural red* adalah pewarna yang bersifat kationik yang berpenetrasi ke dalam membran sel secara difusi non ionik dan akan terakumulasi secara intraseluler dalam lisosom (*natural red* berikatan dengan sisi anionik pada lisosom) (Borenfreud dan Pruerne, 1985). Proses inilah yang selanjutnya dideteksi dengan pengukuran serapan menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 495 – 630 nm dengan pedoman seberapa besar sel yang hidup setelah perlakuan. Berdasarkan hal ini maka akan didapatkan nilai *Letal Concentration* (LC_{50}). LC_{50} adalah konsentrasi yang diberikan dapat menyebabkan 50% kematian obyek yang

diperiksa.

Hasil pengamatan menunjukkan setelah diinkubasi selama 24 jam, ekstrak etanol 50% daun kitolod dapat menghambat pertumbuhan sel kanker serviks pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, dan 125 $\mu\text{g/ml}$. Pada konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ nilai absorbansi lebih kecil dan persentase kematian sel Ca Ski lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, dan 75 $\mu\text{g/ml}$.

Aktivitas antikanker dinyatakan dengan menentukan LC_{50} dari zat aktif murni atau ekstrak yang berasal dari tumbuhan. Menurut *National Cancer Institute* (NCI), ekstrak yang mempunyai $LC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ dan zat aktif murni yang mempunyai $LC_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$, maka dinyatakan aktif sebagai antikanker dan potensial untuk diteliti lebih lanjut (Colegate dan Molyneux, 1993). Sedangkan *American National Cancer Institute* menyatakan bahwa pada dosis yang kurang dari 30 $\mu\text{g/ml}$ adalah dosis yang menjanjikan untuk diteliti lebih lanjut (Torres et al, 2005)

Pada penelitian ini nilai LC_{50} yang didapat lebih besar dari nilai batas yang ditetapkan NCI, yaitu 55,78 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini berarti bahwa ekstrak

**Gambar 1 Hubungan Antara Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dengan Persentase Kematian Sel (%)**

etanol 50 % daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) memiliki efek sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker serviks.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 50% daun kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl) memiliki efek sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker serviks. (Ca Ski)

DAFTAR PUSTAKA

Ali, Iskandar. 2006. Khasiat dan Manfaat Kitolod Penakluk Gangguan pada Mata. Edisi ke-3, Agromedia Pustaka, Jakarta: 1-6.

American Cancer Society. 2001. Cervical Cancer What is cancer? <http://www.cancer.org/>.

Anonim. 2007. *Artikel Tentang Tanaman Obat Departemen Kesehatan RI*, http://iptek.apjii.or.id/artikel/ttg_tanaman_obat/depkes/buku1/1-156.pdf, Jakarta, 7 Januari 2015.

Bhanot, A., Sharma, R., & Noolvi, M. N. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine*, 3(1), 09–26.

Borenfreund E and Puerne AJ. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24 (2-3), 119-124.

Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Aldea, M., et. Al. 2016. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. *Summary Report*. 1-282

Colegate, S., & R. Molyneux, 1993, *Bioactive Natural Product: Detection, Isolation, and Structural Determination*, CRC Press, Inc: 199.

Dalimartha, S., 2004, *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker*, Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta: 1-14, 65-66.

Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.

Departemen Kesehatan RI . 2015. Situasi Penyakit Kanker .Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. www.depkes.go.id

Freshney, I. 1994. *Culture of animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss Inc., New York: 85-88, 154-155, 260-287.

Magaldi, G.T., Almstead, L.L., Bellone, S., Prevat, G.E., et al. 2014. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virologi*, 422(1), 114-124

Mulyani, E.T. 2005. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* [christm.] Roscoe) Terhadap Sel Kanker Payudara (Sel MCF-7) Secara In Vitro. *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945, Jakarta.

Ravi, M., Parames, P., Kaviya, R.S., Anuradha, E., Solomon, P. 2014. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16-26.

Torres, M.R., Sousa, A.P.A., Filho, E.A.T.S., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O., and Costa-Laluto, L.V. 2005. Biological activity of aqueous and organic extract of seaweeds from Ceara State, Brazil. *Arq. Cien. Mar. Fortaleza* 38: 55–63.

Witantri, G.H., Ruspindi, A.C.E., dan Saputro, S.D. 2015. Keanekaragaman pohon berpotensi obat antikanker di kawasan Kampus Ketingan Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversiti Indonesia*, 1(3), 477-483