

Uji Sitotoksitas Fraksi Heksan Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) terhadap Sel *Burkitt's lymphoma In Vitro*

Cytotoxicity Test of Hexane Fraction of Myrmecodia pendens Merr. & Perry against Burkitt's lymphoma In Vitro

Amalia Dyah Fitri Wulandari¹, Ana Medawati²

¹Mahasiswa Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

²Dosen Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Latar Belakang: Keganasan (kanker) adalah salah satu penyakit yang menyebabkan kematian dalam jumlah besar di dunia. *Burkitt's lymphoma* merupakan jenis keganasan dengan laju pertumbuhan paling cepat dibandingkan yang lain. *Burkitt's lymphoma* yang terjadi di dalam rongga mulut dapat menyebabkan kerusakan tulang alveolar dan mobilitas gigi. Terapi *Burkitt's lymphoma* dengan kemoterapi menimbulkan efek samping seperti *xerostomia*, *mucositis*, gangguan pengecapan serta perdarahan. Terapi alternatif menggunakan tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) dipilih sebagai pengobatan kanker dengan efek samping minimal. Tanaman *M. pendens* diketahui kaya akan fitokimia antara lain flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan tokoferol yang berpotensi sebagai antikanker, antibakteri, antioksidan dan lain-lain. Fraksi heksan tanaman *M. pendens* digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel *Burkitt's lymphoma*.

Tujuan: Untuk menguji potensi sitotoksik fraksi heksan tanaman *Myrmecodia pendens* Merr. & Perry terhadap sel *Burkitt's lymphoma*.

Metode: Penelitian eksperimental laboratoris murni *in vitro* dengan perlakuan berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens* terdiri dari konsentrasi 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 dan 1000 µg/mL terhadap kultur sel *Burkitt's lymphoma* yang telah terpapar virus *Eipstein-Barr*. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT Assay untuk memperoleh viabilitas sel *Burkitt's lymphoma* yang digunakan dalam penentuan nilai IC_{50} fraksi heksan tanaman *M. pendens*.

Hasil : Penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi heksan tanaman *M. pendens* tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel *Burkitt's lymphoma* karena persentase kematian sel *Burkitt's lymphoma* tidak menunjukkan fenomena *dose-dependent* terhadap berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens*. Hal ini dapat terjadi karena adanya kesalahan dalam prosedur penelitian.

Kesimpulan : Fraksi heksan tanaman *M. pendens* tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel *Burkitt's lymphoma in vitro*

Kata Kunci: sel *Burkitt's lymphoma*, uji sitotoksitas, fraksi heksan, *Myrmecodia pendens* Merr. & Perry

Abstract: Cancer is one of the disease that cause a large number of death in the world. *Burkitt's lymphoma* is a type of malignancy with the fastest growth rate than others. *Burkitt's lymphoma* that is happened in oral cavity can cause alveolar bone defect and tooth mobility. Treatment of *Burkitt's lymphoma* using chemotherapy has side effect such as, *xerostomia*, *mucositis*, *dysphagia* and also bleeding. The alternative treatment by using Ant-nest plant (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) is choosen because of minimal side effect. This plant is known as source of phytochemicals like flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid and tokoferol, they have role as anticancer, antibacterial, antioxidant and so on. Hexane fraction of *M. pendens* is used to inhibit cell growth of *Burkitt's lymphoma*.

Objective: The research is aimed to test cytotoxic potential of hexane fraction from *M. pendens* against *Burkitt's lymphoma*.

Method: This was a purely laboratory experimental *in vitro* by various concentrations of hexane fraction from *M. pendens*, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL against *Burkitt's lymphoma* which was already exposed by *Eipstein-Barr* virus. This cytotoxicity test used MTT Assay method to obtain viability of *Burkitt's lymphoma* that is used to determine the value of IC_{50} of hexane fraction from *M. pendens*.

Result: The result showed that hexane fraction of *M. pendens* does not show cytotoxic activity against Burkitt's lymphoma because there was no dose-dependent phenomenon between concentration of hexane fraction and the Burkitt's lymphoma death percentage.

Conclusion: It can be concluded that hexane fraction of *M. pendens* does not have cytotoxic potential against Burkitt's lymphoma in vitro.

Keywords: Burkitt's lymphoma, cytotoxicity test, hexane fraction, *Myrmecodia pendens* Merr. & Perry.

Pendahuluan

Kanker adalah salah satu penyakit yang menyebabkan kematian dalam jumlah besar di dunia. Tidak hanya orang dewasa yang menjadi penderita kanker, tetapi anak-anak juga memiliki potensi mengidap kanker. Dua belas juta orang dalam skala global diprediksi terserang kanker dengan angka kematian sebesar 7,6 juta. Angka penderita kanker dapat meningkat hingga 26 juta pada tahun 2030 dengan kejadian meninggal karena kanker sebanyak 17 juta. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan di dunia terdapat 175.000 kasus kanker terbaru pada anak dan 96.400 diantaranya meninggal dunia¹. Salah satu bentuk keganasan (kanker) di rongga mulut adalah *Burkitt's lymphoma*². *Burkitt's lymphoma* memiliki laju pembelahan sel yang tergolong paling cepat dibandingkan dengan tumor yang lain, salah satunya dengan keberadaan sel pertumbuhan dengan fraksi tinggi. *Ki-67* merupakan tanda spesifik untuk siklus sel yang menunjukkan perkembangan sel tumor

pada siklus sel lebih dari 95%³. Terapi untuk *Burkitt's lymphoma* salah satunya dapat dilakukan dengan kemoterapi. Kemoterapi dapat menimbulkan efek samping pada rongga mulut berupa *xerostomia*, *mucositis*, gangguan pengecapan serta perdarahan⁴. Upaya alternatif diperlukan untuk meminimalisasi terjadinya efek samping dalam terapi *Burkitt's lymphoma*. Salah satu upaya alternatif yang dapat dilakukan dengan menggunakan bahan herbal berupa tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry).

Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry) merupakan tanaman epifit yang mampu berinteraksi dengan semut jenis *Ochetellus sp*⁵. Tanaman tersebut banyak ditemukan di Provinsi Papua, terutama di daerah Pegunungan Tengah, yaitu di Hutan Belantara, Kabupaten Jayawijaya, Kabupaten Tolikara, Kabupaten Puncak Jaya, Kabupaten Pegunungan Bintang dan Kabupaten Paniai⁶. Masyarakat Papua

menggunakan tanaman *M. pendens* sebagai obat untuk masalah nyeri otot serta sebagai penguat sistem imun tubuh. Tanaman *M. pendens* mengandung senyawa flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, tanin serta antioksidan berupa tokoferol. Senyawa flavonoid yang teridentifikasi dalam sarang semut antara lain kaempferol, luteoline, rutin, quercetin dan apigenin⁷. Flavonoid dapat berperan sebagai inhibitor poten terhadap beberapa enzim seperti *xanthine oxidase* (XO), *cyclo-oxygenase* (COX), *lipoxigenase* dan *phosphoinositide 3-kinase*⁸. Triterpenoid dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antivirus, antitumor serta mempunyai aktivitas insektisidal yang berguna dalam terapi penyakit vaskuler dan metabolik⁹. Saponin merupakan senyawa metabolit sekunder hasil sintesis oleh berbagai spesies tumbuhan. Saponin mempunyai manfaat dalam dunia medis antara lain sebagai antitumor, antiinflamasi antimikrobia dan hepatoprotektif¹⁰. Tanin tersusun atas senyawa fenolik yang sukar terurai dan mengkristal, membuat protein dari larutan mengalami pengendapan dan membentuk senyawa dengan protein. Tanin mampu menghambat pertumbuhan tumor dan enzim *reverse*

transcriptase dan *DNA topoisomerase*¹¹.

Evaluasi preklinik menjadi hal yang penting guna mengetahui potensi aktivitas neoplastik. Salah satu evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mempunyai kandungan berbahaya (toksik) secara biologis adalah uji sitotoksitas. Uji sitotoksitas mempunyai syarat yaitu menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, serta terdapat hubungan linier antara kriteria respon dengan jumlah sel yang diuji¹².

Heksan mempunyai sifat yang mudah menguap, mempunyai titik didih rendah sehingga mudah dikonsentrasikan dalam proses ekstraksi cair-cair¹³.

Penelitian serta publikasi terhadap jenis tanaman sarang semut tentang pengujian bahan kimia yang terkandung di dalamnya telah banyak dilakukan, terutama pada jenis *M. pendens* dan *M. tuberosa*¹⁴. Hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa penggunaan tanaman *M. pendens* sebagai terapi herbal mempunyai efek samping minimal dibandingkan dengan kemoterapi dengan efek samping lebih besar serta biaya yang mahal¹⁵. Penelitian ini bertujuan untuk menguji

potensi sitotoksik fraksi heksan tanaman *M. pendens* terhadap sel

Metode Penelitian

Desain penelitian ini merupakan eskperimental laboratoris murni secara *in vitro*. Sel kanker uji dalam penelitian menggunakan sel *Burkitt's lymphoma* yang dibiakkan dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) yang diberi *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. Bahan uji dalam penelitian ini adalah fraksi heksan tanaman *M. pendens* dengan konsentrasi (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625) $\mu\text{gr/mL}$ serta kontrol sel *Burkitt's lymphoma*.

a) Pembuatan ekstrak dan fraksi heksan

Pembuatan ekstrak tanaman *M. pendens* menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96% dan fraksinasi menggunakan metode corong pisah untuk mendapatkan fraksi heksan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Tanaman *M. pendens* dipilih dan diambil sebanyak 1000 gram kemudian dicuci dengan air mengalir dan dipotong menjadi beberapa bagian. Setelah itu, potongan tanaman *M. pendens* dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Kemudian, setelah kering tanaman dijadikan serbuk menggunakan mesin

Burkitt's lymphoma

penyerbuk hingga halus. Sebelum dilakukan proses maserasi, tanaman *M. pendens* yang sudah berbentuk serbuk ini akan dilakukan proses penyaringan lemak terlebih dahulu dengan cara direndam dalam *petroleum eter* agar tidak mengganggu proses ekstraksi. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi kemudian disaring sebanyak 3 kali menggunakan corong *bruncher* sehingga didapat filtrat I. Filtrat I kemudian diuapkan dengan *waterbath*, sedangkan ampasnya kembali dimaserasi menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam. Setelah itu, filtrat disaring lagi sehingga didapatkan filtrat II dan ampasnya dimaserasi lagi untuk mendapatkan filtrat III. Untuk memperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%, filtrat I, filtrat II dan filtrat III dicampur kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60-70°C. Untuk mendapatkan fraksi heksan, ekstrak etanol ditambahkan sedikit pelarut etanol 96% lalu diaduk sampai larut, tambahkan akuades, kemudian fraksinasi dengan pelarut heksan, kocok dan didiamkan hingga terbentuk 2

lapisan yaitu lapisan fraksi heksan dan lapisan residu fraksi heksan.

b) Preparasi sel *Burkitt's lymphoma*

Sel *Burkitt's lymphoma* dibiakkan dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) dan diberi *Fetal Bovine Serum* (FBS 10%), kemudian diinkubasi selama 24 jam. Sel *Burkitt's lymphoma* dibiakkan dalam larutan RPMI-1640, FBS 10%, antibiotik penisillin-streptomisin 2% dan fungizon 0,5%. Sel di inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5%. Setelah itu, dilakukan perhitungan sel yang dibutuhkan dengan menggunakan bilik hitung dan didapatkan hasil sel yang diperlukan yaitu 5×10^4 cell/well.

c) Uji sitotoksisitas dengan metode MTT Assay

Uji sitotoksisitas dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah

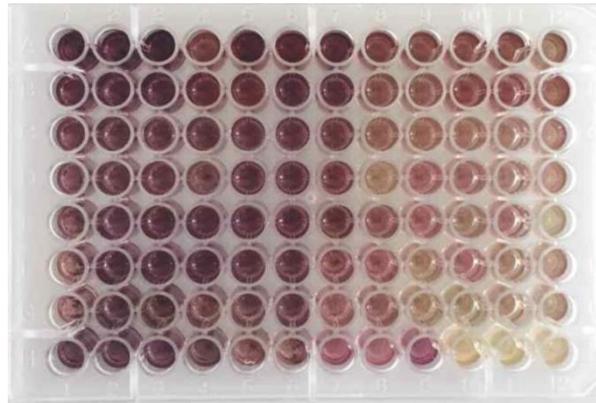
Mada. MTT Assay menggunakan prinsip reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) direduksi menjadi garam formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan reagen stopper. Fungsi *reagen stopper* untuk melisis membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi).

Penelitian yang telah selesai dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA reader dan hasilnya diperoleh nilai absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka dapat dihitung persentase kematian sel dengan rumus berikut:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol sel}}{\text{Absorbansi kontrol sel}} \times 100\%$$

Setelah memperoleh persentase sel hidup, selanjutnya dilakukan pengurangan dari 100% terhadap % sel hidup sehingga diperoleh persentase kematian sel.

Hasil Penelitian



Gambar 1. Sumuran sel *Burkitt's lymphoma* setelah *treatment* dengan berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens* dan MTT Assay

Pada Gambar 1. merupakan hasil sumuran sel *Burkitt's lymphoma* yang telah diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens*. Pada sumuran tersebut dapat dilihat intensitas warna ungu lebih banyak dibandingkan warna

kuning. Hal ini bermakna masih terdapat banyak sel yang hidup setelah *treatment* dan MTT Assay. Berdasarkan hasil sumuran tersebut dapat disajikan ke dalam bentuk tabel rerata kematian sel *Burkitt's lymphoma* berikut ini pada Tabel 1.

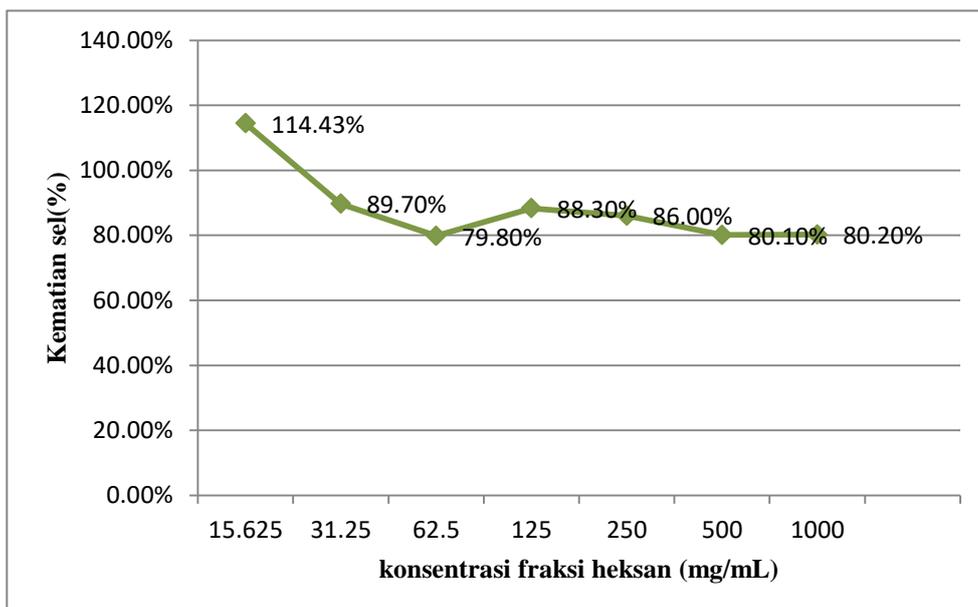
Tabel 1. Rerata kematian sel *Burkitt's lymphoma*

Konsentrasi Fraksi Heksan <i>M. pendens</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kematian Sel (%)
15.625	114.43%
31.25	89.70%
62.5	79.80%
125	88.30%
250	86.00%
500	80.20%
1000	80.20%

Berdasarkan data pada Tabel 1. dapat diketahui bahwa fraksi heksan tanaman *M. pendens* tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel *Burkitt's lymphoma*. Hal ini dapat dilihat dari tabel rerata kematian sel yang menunjukkan semakin tinggi konsentrasi fraksi heksan menyebabkan persentase kematian sel yang fluktuatif. Dimulai dari konsentrasi 15.625 µg/mL persentase kematian sel melebihi 100% karena nilai viabilitas yang didapat dari hasil absorbansi bernilai negatif yaitu nilai absorbansi perlakuan kurang dari nilai absorbansi kontrol sel. Pada konsentrasi 31.25 µg/mL didapatkan persentase kematian

sel sebesar 89.7% yang merupakan persentase kematian sel tertinggi. Kemudian pada konsentrasi 62.5 µg/mL terjadi penurunan kematian sel menjadi 79.8%, meningkat kembali pada konsentrasi 125 µg/mL menjadi 88.3% dan menurun menjadi 86% pada konsentrasi 250 µg/mL. Pada konsentrasi 500 µg/mL dan 1000 µg/mL persentase kematian sel diperoleh sebesar 80.20%.

Kondisi fluktuatif persentase kematian sel *Burkitt's lymphoma* setelah diberi perlakuan berbagai konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens* disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 5. berikut



Gambar 5. menunjukkan bahwa terjadi penurunan kematian sel pada konsentrasi 31.25 $\mu\text{g/mL}$ dan 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi 125 $\mu\text{g/mL}$ persentase kematian sel meningkat menjadi 88.30%, kemudian menurun menjadi 86% pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ selanjutnya menurun menjadi 80.10% dan meningkat kembali pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 80.20%.

Pembahasan

Berdasarkan grafik antara konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens* dengan persentase kematian sel *Burkitt's lymphoma* didapatkan bahwa pemberian berbagai macam konsentrasi fraksi heksan tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap kematian sel *Burkitt's lymphoma*. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi terendah 15.625 $\mu\text{g/mL}$, nilai persentase kematian lebih dari 100% karena nilai absorbansi perlakuan pada konsentrasi 15.625 $\mu\text{g/mL}$ kurang dari nilai absorbansi kontrol sel, hal tersebut dikonfirmasi pada warna sumuran perlakuan konsentrasi 15.625 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan warna ungu yang bermakna sel *Burkitt's lymphoma* masih hidup setelah perlakuan dan uji *MTT Assay*, sedangkan pada konsentrasi 31.25 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai potensi yang sama dengan konsentrasi 125 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ terhadap persentase kematian sel, dilanjutkan pada konsentrasi 62.5 $\mu\text{g/mL}$ persentase kematian sel menurun menjadi 79.8%. Pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai

potensi yang sama terhadap kematian sel *Burkitt's lymphoma*.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa fraksi heksan tanaman *M. pendens* tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel *Burkitt's lymphoma*. Hasil tersebut tidak sesuai dengan prinsip uji sitotoksitas yaitu adanya fenomena *dose-dependent*. Fenomena tersebut mempunyai makna bahwa semakin besar konsentrasi paparan yang diberikan akan menyebabkan persentase kematian sel yang besar, sedangkan dalam penelitian ini diperoleh hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi fraksi heksan tanaman *M. pendens* menyebabkan semakin rendah persentase kematian sel ditandai dengan warna sumuran yang berubah menjadi warna ungu sebagai indikator bahwa sel tersebut tetap hidup pada konsentrasi tinggi setelah prosedur *MTT Assay* dan diberi perlakuan *stopper*. Ketidaksesuaian hasil pada penelitian tersebut disebabkan karena adanya kesalahan prosedur penelitian.

Penyebab pertama yaitu adanya pengaruh warna dari sampel yaitu fraksi heksan tanaman *M. pendens*. Menurut penelitian yang telah dilakukan¹⁶ sampel yang berwarna dapat memberikan nilai absorbansi saat dibaca dengan ELISA reader, sehingga diperlukan adanya kontrol sampel untuk mengeliminasi pengaruh absorbansi dari sampel karena berwarna.

Penyebab kedua yaitu penggunaan pelarut untuk pengenceran sampel yang digunakan pada penelitian adalah DMSO (*dimethyl sulfoxide*). DMSO merupakan pelarut aprotik dengan polaritas *inetrmediet* yang memberikan kemampuan untuk melarutkan metabolit polar dan nonpolar. DMSO mempunyai efek toksik tertentu pada organisme atau sel uji¹³. Hal tersebut mempengaruhi hasil absorbansi yang dibaca pada ELISA reader.

Kesimpulan

Fraksi heksan tanaman *M. pendens* tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel *Burkitt's lymphoma*.

Daftar Pustaka

1. Cahyati R. Komunikasi Antarpribadi Anggota Komunitas 3C Terhadap Anak dengan Kanker. 2015;: p. 3-14.

Penyebab lain yang menyebabkan hasil absorbansi pada penelitian ini menjadi bias adalah pada saat melakukan melakukan *treatment* pada sel di dalam sumuran, tidak dilakukan penggantian *tip* untuk konsentrasi yang berbeda, hal tersebut dapat menyebabkan proses transfer sel dari media ke sumuran tidak maksimal. Penggantian *tip* setiap konsentrasi perlu dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi¹⁷. Menurut Syamsuri¹⁸ prosedur penggunaan mikropipet harus dilakukan dengan hati-hati, karena sedikit kesalahan akan mempengaruhi hasil kerja sehingga harus mengulang prosedur kerja.

Berdasarkan pembahasan yang telah diuraikan tersebut, hasil penelitian yang telah dilakukan tidak sesuai dengan hipotesis pada penelitian karena hasil penelitian tidak menunjukkan potensi sitotoksik dari fraksi heksan tanaman *M. pendens* terhadap sel *Burkitt's lymphoma*..

2. Regezi JA, Scubba JJ, Jordan RCK. Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations. 4th ed. St.Louis: Saunders; 2003.
3. Hecht J, Aster J. Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma. Journal of

- Clinical Oncology. 2000 November; 18(21): p. 3707-3721.
4. Prawira MA. Gambaran Komplikasi Oral Pada Pasien yang Menjalani Kemoterapi di Badan Layanan Umum RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado. Jurnal Ilmiah Kedokteran Gigi. 2013 Agustus ; 1.
 5. Subroto M, Saputro H. Gempur Penyakit dengan Sarang Semut Depok: Penebar Swadaya; 2006.
 6. Muhammad A. Deskripsi Sarang Semut. In Sarang Semut dan Buah Merah Pembasmi Ragam Penyakit Ganas. 1st ed. Jakarta: TransMedia; 2011. p. 12-14.
 7. Engidaa AM, Kasima NS, Tsigie YA, Ismadji S, Huynh LH, Jua YH. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). Industrial Crops and Products. 2013;(41): p. 392-396.
 8. Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: An Overview. Journal of Nutritional Science. 2016; 5(47): p. 1-15.
 9. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. The Royal Society of Chemistry. 2013; 30: p. 1028-1065.
 10. Moghimipour E, Handali S. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. Annual Research & Review in Biology. 2015; 5(3): p. 207-220.
 11. Malangngi LP, Sangi MS, Paendong JJ. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). Jurnal MIPA Unsrat. 2012; 1(1): p. 5-10.
 12. CCRC. [Online].; 2010 [cited 2019 April 10].
 13. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural Products Isolation. 2nd ed. New Jersey: Humana Press ; 2006.
 14. Mardany MP. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Sitotoksik dari Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia beccarii* Hook.f.) Asal Kabupaten Merauke. Jurnal Biologi Papua. 2016 April.; p. 13-22.
 15. Achmad H, Supriatno , Marhamah , Rasmidar. Aktivitas antikanker dan antiproliferasi fraksi etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) pada sel kanker lidah manusia SP-C1. Dentofasial. 2014; 13(1): p. 1-6.
 16. Dona R, Sulistyani N, Nurani LH. Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Ekstrak Etanol Daun Leunca (*Solanum nigrum* L.) terhadap Sel Raji. Pharmacia. 2016; 6(2): p. 1-10.
 17. Arini ND. Makalah Instrumentasi Mikropipet. Jambi ; 2016.
 18. Syamsuri I. Biologi Jakarta : Erlangga ; 2004.