

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak n-Heksana, Diklorometana, dan Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) terhadap Sel Kanker Leher Rahim (HeLa)

Endah Puspitasari^{(a)*}, Bayu Agustina^(a), Nuri^(a), Evi Umayah Ulfa^(a)

^(a) Fakultas Farmasi Universitas Jember, Jember, Indonesia

Eksplorasi agen kemopreventif kanker masih terus dikembangkan, terutama yang berasal dari bahan alam. Hal ini didasari oleh keinginan untuk menekan angka kematian akibat kanker dan mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh terapi kanker yang saat ini digunakan. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) terhadap sel kanker leher rahim yang merupakan kanker ginekologi peringkat pertama yang menyerang wanita. Aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap ekstrak n-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas terhadap sel HeLa dengan metode perhitungan langsung menggunakan bantuan perwarna *trypan blue*. Nilai IC_{50} dari ketiga ekstrak daun beluntas berturut turut adalah 18,06 $\mu\text{g/ml}$, 74,56 $\mu\text{g/ml}$, dan 31,21 $\mu\text{g/ml}$. Ketiganya memberikan perbedaan yang signifikan. Ketiga ekstrak yang diuji memiliki aktivitas sitotoksik dan dapat dikembangkan sebagai kandidat agen kemopreventif kanker. Namun masih perlu diteliti lebih lanjut bagaimana mekanisme aksi yang menjadi perantara aktivitas sitotoksik tersebut.

Kata Kunci: *Pluchea indica* Less., ekstrak n-heksana, ekstrak diklorometana, ekstrak metanol, sitotoksik, sel HeLa

Cytotoxic Activity of n-Hexane, Dichlormethane, and Methanol Extract of Beluntas Leaves (*Pluchea indica* Less.) on Cervical Cancer Cell Line, HeLa

The exploration on cancer chemopreventive agent was still developed since cancer deaths seem to be increasing and for reducing cancer therapies' side effects used nowadays. The exploration was especially done on natural products. This study was conducted to determine the cytotoxic activity of n-hexane, dichloromethane, and methanol extract of beluntas leaves (*Pluchea indica* Less.) on cervical cancer cell line, the first gynecology cancer on women. Cytotoxic activity was done based on direct counting method on HeLa cell line using trypan blue. The IC_{50} value was 18.06 $\mu\text{g/ml}$, 74.56 $\mu\text{g/ml}$, and 31.21 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Three of them had significance difference result. All of them had cytotoxic activity and was potential to be developed as cancer chemopreventive agent. But it was necessary to explore further mechanisms of action of the cytotoxic activity.

Keywords: *Pluchea indica* Less., n-hexane extract, dichlormethane extract, methanol extract, cytotoxic, HeLa cells.

*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37, Kampus Tegalboto, Jember 68121, Jawa Timur, Indonesia, phone / fax number : +62 -331-324736, e-mail: e.puspitasari@unej.ac.id

PENDAHULUAN

Eksplorasi agen kemoprevensi kanker terus menerus dikembangkan saat ini. Hal ini dikarenakan oleh kenyataan bahwa angka kematian akibat kanker semakin meningkat dari tahun ke tahun (WHO, 2014). Selain itu, metode pengobatan konvensional masih memiliki banyak efek samping yang tidak diinginkan, misalnya kemoterapi (NCI, 2014^a). Agen kemoprevensi kanker lebih unggul dibandingkan agen kemoprevensi yang sudah digunakan dalam terapi kanker. Sebab tidak hanya ditujukan untuk mengobati kanker saja, agen kemoprevensi kanker lebih ditujukan untuk mengurangi risiko, menghambat pertumbuhan kanker, atau menghambat kekambuhan kanker (NCI, 2014^b). Eksplorasi agen kemoprevensi saat ini cenderung dilakukan terhadap bahan alam.

Salah satu bahan alam yang memiliki potensi tersebut adalah beluntas (*Pluchea indica* Less.). Berdasarkan kemotaksonomi, tumbuhan famili Asteraceae, misalnya *Baccharis coridifolia* dan *Baccharis ochracea*, memiliki aktivitas antikanker. Keduanya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel tumor manusia HT29, NCI-H460, dan U373 *in vitro* dengan nilai IC₅₀ di bawah 5 µg/mL (Monks *et al.*, 2002). Oleh karena itu, kemungkinan besar beluntas juga memiliki aktivitas yang mirip.

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui potensi antikanker beluntas melalui aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker leher rahim. Kanker leher rahim dipilih karena menduduki peringkat pertama penyebab kematian akibat kanker pada wanita di Indonesia (Aziz, 2009). Uji sitotoksitas dilakukan terhadap ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas untuk lebih mengerucutkan senyawa yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat untuk ekstraksi: bejana maserasi, *rotary evaporator* (Heidolph), oven (Memmert). Alat untuk uji *in vitro* adalah: *laminar air flow cabinet* (Labconco), inkubator CO₂ (Heraeus), *inverted microscope* (Carl Zeiss), neraca analitik (Sartorius), *tissue culture flask/dish* diameter 10 cm (Iwaki), mikropipet (Pipetman[®] neo Gilson), *haemocytometer* (Nebauer improved), *96-well plate* (Iwaki), serta kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels).

Bahan

Daun beluntas dari daerah Summersari, Kabupaten Jember yang memiliki bentuk fisik bagus, segar, berwarna hijau terang, kultur sel kanker leher rahim, HeLa (koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM), *n*-heksana, diklorometana, dan metanol untuk ekstraksi (teknis redistilasi). Pelarut sampel: dimetil sulfoxida (DMSO) (Sigma). Media pertumbuhan sel HeLa: RPMI 1640 (Gibco), *fetal bovine serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), fungizone 0,5% (Gibco). Etanol 70%, *phosphate buffered saline* (PBS). Pewarna sel: *trypan blue*.

Jalan Penelitian

Ekstraksi Daun Beluntas

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 250 g serbuk daun beluntas diekstraksi berturut-turut menggunakan *n*-heksana, diklorometana, dan metanol masing-masing 3x24 jam. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, dilanjutkan dengan oven pada suhu 40°C. Ekstrak pekat selanjutnya dilarutkan dalam DMSO untuk pengujian.

Uji Sitotoksitas terhadap Sel HeLa dengan Metode Perhitungan Langsung

Sel HeLa (2x10⁴ sel/sumuran) didistribusikan ke dalam *96-well plate*, kemudian ditambahkan 100 µl seri konsentrasi senyawa uji, diinkubasi 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C dan dialiri dengan 5% CO₂. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,25 µg/ml; 15,63 µg/ml. Setelah diinkubasi selama 24 jam, sel dikeluarkan dari inkubator, dan ditambahkan 100 µl larutan *trypan blue* 0,5% pada tiap sumuran. Dihomogenkan dan sesegera mungkin (±2 menit) diambil 10 µl sampel kemudian dihitung sel yang hidup dan mati menggunakan *haemocytometer*.

Analisis Data

Jumlah sel hidup dan sel mati dari masing-masing sumuran (perlakuan dan kontrol) dalam *plate* dihitung langsung di bawah *inverted microscope*, kemudian ditentukan persentase kematian sel dengan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah sel hidup kontrol} - \text{jumlah sel hidup sampel}}{\text{jumlah sel hidup kontrol}} \times 100 \%$$

Analisis probit digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀. Analisis varian (ANOVA) satu arah digunakan untuk mengetahui perbedaan bermakna nilai IC₅₀ antara ketiga ekstrak tersebut. Bila menunjukkan perbedaan bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Different*) dengan tingkat kepercayaan 95%.

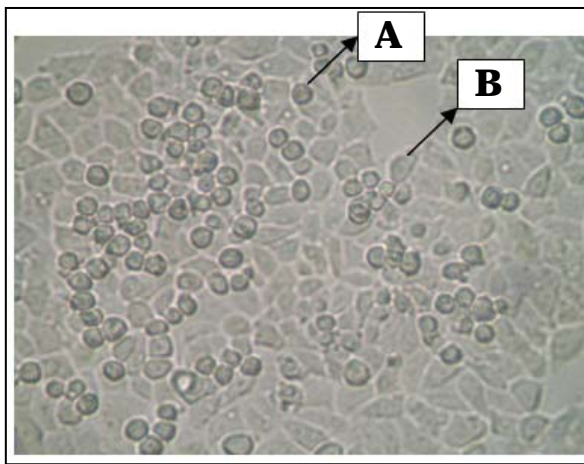
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi daun beluntas menghasilkan ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol seperti pada **Tabel 1**. dapat dilihat bahwa diklorometana mampu menarik lebih banyak senyawa dalam daun beluntas yang tercermin dari nilai rendemen ekstrak dikloro-metana dibandingkan dengan *n*-heksana dan metanol.

Uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung didasarkan pada morfologi sel HeLa. Sel yang hidup akan tampak seperti daun jika menempel dalam *plate*, bulat jika melayang dalam media, bersinar cemerlang, dan batas membran dengan media akan kelihatan jelas (**Gambar 1**). Sedangkan sel yang mati akan tampak mengkerut, gelap, tidak bercahaya, dan membran selnya terlihat pecah atau agak samar. Untuk mempermudah pengamatan digunakan zat warna *trypan blue*, sehingga di dalam mikroskop sel hidup tampak bulat dan bersinar cemerlang serta batas membran dengan media akan kelihatan jelas sedangkan sel mati tampak berwarna biru dan membran selnya pecah (**Gambar 2**).

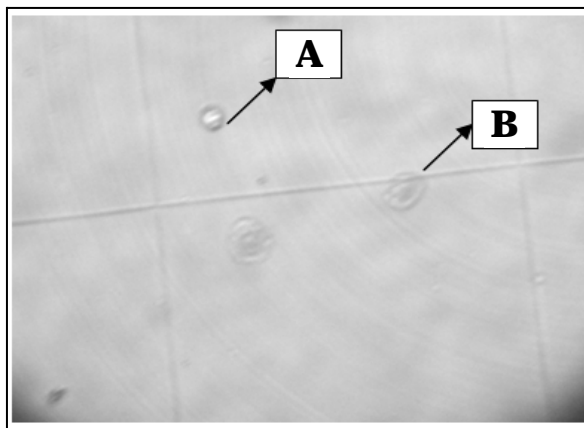
TABEL 1. Hasil Ekstraksi Daun Beluntas

| Pelarut | Berat ekstrak kering (g) | Rendemen (% b/b) |
|---------------|--------------------------|------------------|
| n-heksana | 14,5310 | 5,812 |
| diklorometana | 21,7697 | 8,707 |
| metanol | 20,2174 | 8,087 |



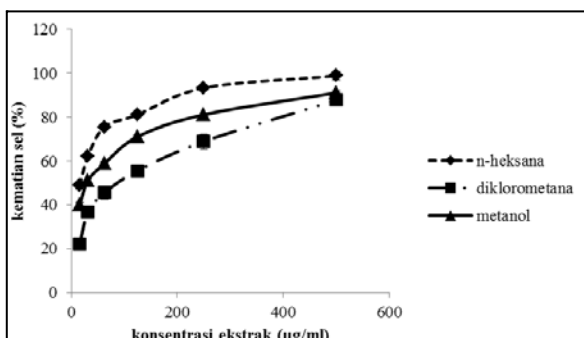
Gambar 1. Morfologi sel HeLa akibat perlakuan.

Keterangan : Sel HeLa yang melayang berbentuk bulat (A), sedangkan sel HeLa yang menempel di dasar *plate* berbentuk seperti daun (B). Sel diamati di bawah *inverted microscope* dengan perbesaran 400x.



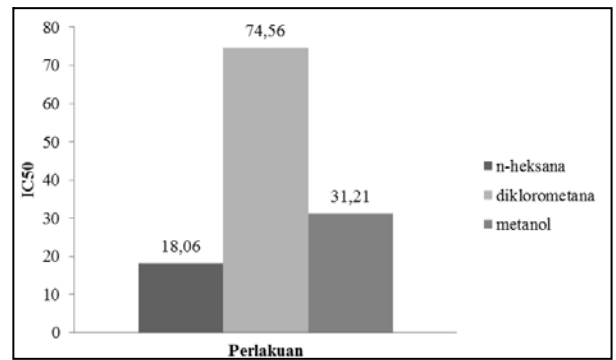
Gambar 2. Pengamatan sel HeLa dengan pewarnaan *trypan blue*.

Keterangan : Sel HeLa yang masih hidup tampak bulat dan bersinar cemerlang serta batas membran dengan media akan kelihatan jelas (A) sedangkan sel mati tampak berwarna biru dan membran selnya pecah (B). Sel diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.



Gambar 3. Hasil uji sitotoksitas ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas terhadap sel HeLa (24 jam).

Keterangan : Aktivitas sitotoksik ketiga ekstrak menunjukkan tren yang sama, yaitu tergantung kadar. Semakin tinggi kadar



ekstrak, sel HeLa yang mati semakin besar. Data kematian sel disajikan dalam rerata ± SD (n = 3).

Gambar 4. Nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas terhadap sel HeLa (24 jam).

Keterangan : Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0,05).

Hal ini disebabkan karena terjadinya penurunan integritas membran pada sel yang mati sehingga *trypan blue* dapat masuk ke dalam dan mewarnai sel, sedangkan sel yang hidup tidak berwarna dan bersinar cemerlang karena membran selnya masih utuh.

Hasil uji sitotoksitas ketiga ekstrak daun beluntas disajikan dalam **Gambar 3**. Ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas memiliki kecenderungan aktivitas sitotoksik yang sama, yaitu tergantung kadar. Semakin tinggi kadar ekstrak, sel HeLa yang mati semakin besar, artinya semakin besar aktivitas sitotoksiknya.

Nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas berturut-turut adalah 18,06 µg/ml, 74,56 µg/ml, dan 31,21 µg/ml (**Gambar 4**). Hasil uji LSD menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang berbeda secara signifikan.

Suatu ekstrak dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik potensial jika memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 100 µg/ml (Prayong, Barusrux, dan Weerapreeyakul, 2008). Ketiga macam ekstrak daun beluntas yang diujikan terhadap sel HeLa mempunyai nilai IC₅₀ kurang dari 100 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana, diklorometana dan metanol daun beluntas mempunyai efek sitotoksik yang potensial terhadap sel HeLa. Semakin rendah nilai IC₅₀ semakin besar potensi ketoksikannya, berarti ekstrak *n*-heksana merupakan ekstrak yang paling poten dari ketiga ekstrak tersebut.

Berdasarkan penelitian Kurniawati (2008), ekstrak *n*-heksana daun beluntas mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, dan terpenoid. Terpenoid yang terambil dalam pelarut ini diduga jenis hemiterpenoid, monoterpenoid, seskuiterpenoid, dan tetraterpenoid (Robinson, 1995) dan alkaloid yang terambil dalam pelarut ini diduga dalam bentuk basa (Evans dan Trease, 2003). Diklorometana merupakan pelarut semipolar, sehingga akan melarutkan senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang sama (*like dissolve like*). Senyawa tersebut diduga beberapa golongan senyawa terpenoid seperti diterpenoid

dan triterpenoid dan golongan flavonoid seperti isoflavon, flavanon, flavon dan flavonol (Harborne, 1987). Metanol merupakan pelarut polar sehingga kemungkinan senyawa yang terambil adalah senyawa yang bersifat polar. Senyawa-senyawa tersebut seperti beberapa golongan senyawa alkaloid yang berbentuk garam (Evans dan Trease, 2003), flavonoid, tanin, saponin, polifenol dan vitamin C (Harborne, 1987).

Senyawa terpenoid dapat memblokir siklus sel pada fase G₂/M dengan menstabilkan benang-benang *spindle* pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat (Setiawati *et al.*, tanpa tahun). Banyak golongan terpenoid dari tumbuhan yang mampu menghambat pertumbuhan kanker (sitostatik) atau bahkan bersifat sitotoksik. Contoh senyawa terpenoid yang bersifat sitotoksik melalui mekanisme penghambatan mitosis pada fase G₂ dan M adalah paklitaksel/taxol (Soekardjo dan Siswandono, 2000).

Senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim xantin oksidase, siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam proses prooksidasi sehingga menunda siklus sel. Aktivitas antikanker juga ditunjukkan flavonoid melalui induksi apoptosis. Flavonoid menghambat ekspresi enzim topoisomerase I dan topoisomerase II yang berperan dalam katalisis pemutaran dan relaksasi DNA. Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan menyebabkan DNA terpotong dan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis seperti Bax dan Bak dan menurunkan ekspresi protein-protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-XL. Dengan demikian pertumbuhan sel kanker terhambat. Sebagian besar flavonoid telah terbukti mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia namun bersifat tidak toksik pada sel normal manusia (Ren *et al.*, 2003). Flavonoid yang tersebar luas dalam daun (Harborne, 1987) telah disintesis bermacam-macam turunannya dan dievaluasi aktivitas antitumornya *in vitro* terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7. *2*-hidroxychalcones dan *methoxylated flavonones* menunjukkan aktivitas antiproliferatif yang paling poten terhadap sel kanker payudara, MCF-7 (Chulia, 2001).

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar (Harborne, 1987). Salah satu senyawa alkaloid yang telah terbukti antineoplastik yaitu vincristine yang efektif dalam pengobatan leukimia akut pada anak-anak dan vinblastin yang telah digunakan secara klinis untuk pengobatan *Hodgkin's disease* dan kariokarsinoma (Mahidol *et al.*, 1998). Mekanisme kerjanya sebagai antikanker adalah dengan mengikat tubulin dan menghambat pembentukan komponen mikrotubulin pada kumparan mitosis sehingga metafase berhenti (Soekardjo dan Siswandono, 2000).

Ada beberapa kemungkinan titik tangkap molekuler senyawa alam yang terkandung dalam masing-masing ekstrak sehingga dapat berefek

sebagai antikanker. Kemungkinan pertama, senyawa alam tersebut mampu menghambat signal transduksi. Signal transduksi dimulai dengan adanya rangsangan dari luar yang berupa faktor pertumbuhan yang ditangkap oleh reseptor. Reseptor akan menyampaikan signal proliferasi ke protein di sitoplasma (Hanahan dan Weinberg, 2011). Aktivasi signal transduksi ini melalui proses fosforilasi dengan melibatkan ATP dan protein yang terlibat umumnya adalah jenis protein kinase (Gibbs, 2000). Proses *signal transduction cascades* ini dapat dihambat oleh beberapa senyawa alam yang termasuk inhibitor fosfatase dan inhibitor kinase (Broekman, Giovannetti, dan Peters, 2011). Ekstrak uji mungkin mengandung suatu zat inhibitor kinase sehingga dapat menghambat *signal transduction cascades*. Misalnya karena adanya flavonoid yang dapat berkompetisi dengan ATP dalam proses fosforilasi sehingga fosforilasi terhambat.

Kemungkinan kedua, mempengaruhi program *cell cycle* yaitu dengan menghambat *cell cycle progression* dan menginduksi *cell cycle arrest*. Rangkaian signal transduksi berakhir di nukleus dan sel dari G₀ masuk ke G₁ *phase*. Signal transduksi menginisiasi faktor transkripsi yang akan mentranskripsi gen-gen yang dibutuhkan untuk jalannya *cell cycle* (Hanahan dan Weinberg, 2011). Gen-gen tersebut antara lain *cyclins* dan *cyclin dependent kinase* (cdk). Untuk dapat memfasilitasi G₁ *progression*, kedua protein ini (*D-type cyclins* dan cdk 4 atau 6) harus membentuk kompleks untuk memfosforilasi pRb sehingga memacu *cell cycle progression*. Ekstrak uji mungkin dapat menghambat fosforilasi pRb atau menginduksi INK4 *family proteins* yang merupakan protein penghambat cdk. Hambatan *cell cycle progression* ini juga dapat terjadi pada tiap tahap: *S phase* dan *G₂/M transition* yang biasanya berupa *cell cycle arrest* (Shapiro dan Harper, 1999).

Kemungkinan ketiga, dengan menjaga aktivitas protein p53 dan pRb. Pada sel HeLa sebenarnya p53 dan pRb ada dalam keadaan normal (tidak termutasi), hanya diikat kemudian didegradasi oleh protein E6 dan E7 dari HPV (Desaintes, 1999). Ekstrak uji mungkin mengandung zat yang dapat mencegah degradasi p53 sehingga terjadi apoptosis.

Kemungkinan keempat, dengan menghambat enzim telomerase. Enzim telomerase diekspresi tinggi pada kira-kira 85-90% sel tumor manusia (Sasaki, 2001). Protein E6 dan E7 dari HPV yang menginfeksi sel HeLa dapat menginduksi protein *c-myc* yang dapat memacu enzim telomerase dan mengakibatkan sel bersifat imortal. Ekstrak *n*-heksana, diklorometana dan metanol mungkin mengandung senyawa yang dapat menghambat aktivasi protein E6 dan E7 sehingga enzim telomerase terhambat dan sel dapat mati.

Tanaman lain dari famili Asteraceae yang memiliki aktivitas sebagai antikanker adalah *Gynura procumbens* (Lour.) Merr atau sambung nyawa dan *Silybum marianum*. Ekstrak etanolik dan fraksi fenolik daun sambung nyawa telah terbukti dapat menghambat proliferasi sel HeLa

dan sel T47D serta memacu terjadinya apoptosis (Setiawati *et al.*, tanpa tahun). Daun sambung nyawa mengandung asam fenolat sederhana antara lain asam kafeat, asam p-kumarat, asam p-hidroksi benzoat dan asam fenolat (Harborne, 1987) yang memiliki aktivitas antiproliferatif dan dapat memacu terjadinya apoptosis pada sel kanker payudara T47D *in vitro* (Setiawati *et al.*, tanpa tahun). Senyawa aktif antikanker yang diisolasi dari tanaman *S. marianum* adalah silibinin. Silibinin merupakan senyawa flavonoid yang mampu mereduksi volume dan berat tumor prostat pada mencit (Jenie, Meiyanto, dan Murwanti, 2006). Karena tanaman

di atas sefamili dengan tanaman beluntas maka diduga senyawa-senyawa yang terkandung dalam beluntas hampir sama, sehingga memperkuat dugaan bahwa tanaman beluntas berpotensi sebagai obat antikanker.

KESIMPULAN

Ekstrak *n*-heksana, diklorometana, dan metanol daun beluntas memiliki aktivitas sitotoksik yang potensial terhadap sel HeLa dengan IC₅₀ berturut-turut 18,06 µg/ml, 74,56 µg/ml, dan 31,21 µg/ml. Aktivitas sitotoksik ketiga ekstrak tersebut saling berbeda signifikan satu dengan yang lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aziz MF, 2009, Gynecological Cancer in Indonesia, **JGO**, 20 (1), 8-10.
- Broekman F, Giovannetti E, dan Peters GJ, 2011, Tyrosine Kinase Inhibitors: Multi-Targeted or Single-Targeted?, **WJCO**, 2(2), 80-93.
- Chulia C, 2001, Flavonoids: Structural Requirements for Antiproliferative Activity on Breast Cancer Cell Lines, **Bio-org Med Chem Lett**, 11, 3095-3097.
- Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, dan Thierney F, 1999, Papillomavirus E₂ Induces p53-Independent Apoptosis in HeLa Cells, **Oncogene**, 18, 4583-4545.
- Evans WC dan Trease, 2003, **Pharmacognosy**, 15th ed., University of Nottingham, Nottingham.
- Gibbs JB, 2000, Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research, **Science**, 287 (5460), 1969-1973.
- Hanahan D dan Weinberg RA, 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, **Cell**, 144: 646-674.
- Harborne JB, 1987, **Metode Fitokimia**, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, ITB, Bandung.
- Jenie RI, Meiyanto E, dan Murwanti R., 2006, Efek Antiangiogenetik Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* Lour.) Merr. pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam, **MFI**, 17 (1), 50-55.
- Kurniawati N, 2008, Uji Toksisitas Ekstrak *n*-Heksana, Diklorometana dan Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test, **Skripsi**, Universitas Jember, Jember.
- Mahidol C, Ruchirawat S, Prawat H, Pisutjaroenpong S, Engprasert S, Chumsri P, Tengchaisri T, Sirisinha S, dan Picha P, 1998, Biodiversity and Natural Product Drug Discovery, **Pure Appl Chem**, 70(11), 2065-2072.
- Monks NR, Ferraz A, Sergio B, Machado KR, Lima MFS, Rocha, dan Schwartzmann G, 2002, Invitro Cytotoxicity of Extracts from Brazilian Asteraceae, **Pharm Biol**, 40 (7), 494-500.
- NCI (National Cancer Institute), 2014^a, **Chemotherapy Side Effects Sheets**, available from <http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/physicaleffects/chemo-side-effects>.
- NCI (National Cancer Institute), 2014^b, **Chemoprevention. NCI Dictionary of Cancer Terms**, viewed 22 Agustus 2014, available from <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=45487>.
- Prayong P, Barusrux S, dan Weerapreeyakul N, 2008, Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants, **Fitoterapia**, 79, 598-601.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, dan Zhang L, 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, **Med Res Rev**, 23(4), 519-534.
- Robinson T, 1995, **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**, ITB, Bandung.
- Sasaki S, 2001, Development of Novel Telomerase Inhibitors Based on a Bisindole Unit, **Bioorg Med Chem Lett**, 11, 583-585.
- Setiawati A, Septisetyani EP, Wijayanti TR, dan Rokhman MR, tanpa tahun, Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.) sebagai Agen Kemopreventif, [serial on line] viewed 22 Agustus 2014, available from <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/naskah-gynura-procumbens.pdf> [12].
- Shapiro GI, dan Harper JW, 1999, Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control, **J Clin Inves.**, 104(12), 1645-1653.
- Soekardjo B dan Siswandono, 2000, **Kimia Medisinal**, Jilid II, Airlangga University Press, Surabaya.
- WHO, 2014, **Cancer Fact Sheet No. 297**, viewed 21 Agustus 2014, available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.