

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL *Petrosia* sp.
MENGUNAKAN METODE MIKROTETRAZOLIUM PADA LINI
SEL KANKER PAYUDARA T47D SECARA IN VITRO**

***IN VITRO* CYTOTOXICITY ASSAY OF *Petrosia* sp. ETHANOL
EXTRACT BY USING MTT METHOD OF T47D BREAST CANCER
CELL LINE**

Asniar Pascayantri¹, Mini Bekt Ningsih, Baru Sadarun², Muhammad Hajrul Malaka¹, Adryan
Fristiohady¹, Fadhliyah Malik¹, I Sahidin^{1*}

1. Pharmacy Department,
Faculty of Pharmacy,
Universitas Halu Oleo,
Kampus Hijau Bumi
Tridharma Anduonohu,
Kendari 93232
2. Marine Science
Department, Faculty of
Fisheries and Marine
Science, Universitas Halu
Oleo, Kampus Hijau Bumi
Tridharma Anduonohu,
Kendari 93232

Submitted: 21-10-2021

Revised: 15-11-2021

Accepted: 30-12-2021

*Corresponding author
Sahidin I

Email:
sahidin02@uho.ac.id

ABSTRAK

Peningkatan kanker payudara berbanding lurus dengan kendala dalam aspek pengobatannya seperti efek samping, resistensi obat dan biaya pengobatan yang tinggi. Indonesia dengan keanekaragaman biota laut sangat menarik untuk dilakukan eksplorasi. Spons adalah suatu kelompok biota laut yang berpotensi sebagai kandidat senyawa antikanker. Kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, poliasetilen, poliketida, steroid dan terpenoid memiliki efek farmakologi seperti antiinflamasi, antineoplastik, dan sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. dan mengetahui aktivitas sitotoksiknya pada lini sel kanker payudara T47D. Ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. diperoleh dengan metode maserasi serta dididapatkan berat ekstrak 274,7 g dan nilai rendamen 2,94%. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode mikrotetrazolium dengan parameter nilai IC₅₀ dengan menggunakan *software* GraphPad Prism versi 5. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. memiliki kandungan metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin. Hasil penentuan uji sitotoksik pada ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. dan kontrol positif (5-Fluorourasil) menggunakan lini sel kanker payudara T47D memperoleh nilai IC₅₀ sebesar 78,13 ppm pada ekstrak etanol dan 65,88 ppm atau 65,88 µg/mL pada kontrol positif yang dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. memiliki aktivitas sitotoksik dengan kategori *moderate* sitotoksik/sitotoksik sedang.

Kata Kunci: Kanker payudara, lini sel T47D, Antikanker, IC₅₀, metode MTT, *Petrosia* sp.

ABSTRACT

Breast cancer is increasing as the constraints of side effects, drug-resistant, and high medical costs. Indonesia has a variety of marine biotas that can be explored. The sponge is one of the marines biotas that had potential candidates for anticancer compounds. The secondary metabolites of sponge such as steroids, alkaloids, polyketides, terpenoids, and polyacetylenes have pharmacology effects as anti-inflammation, antineoplastic and cytotoxic activity. The study is aimed to determine the secondary metabolite of *Petrosian* sp. ethanol extract and the cytotoxic activity at the T47D cell line of breast cancer. The ethanol extract of *Petrosian* sp. is obtained by maceration using 96% ethanol as a solvent. Extract weight is obtained 274.7 grams with a 2.94% yield of values. Cytotoxicity assay was using MTT methods with IC₅₀ parameters by using *software* GraphPad prism version 5. Secondary metabolites of *Petrosian* sp. ethanol extract showing alkaloids, flavonoids, steroids, tannins, and saponins. The possible compound that showed anticancer activity is spinasterol. Cytotoxicity activities of *Petrosian* sp. ethanol extracts showing IC₅₀ values at 78.13 ppm and IC₅₀ values at 65.88 ppm on positive control. These results proved cytotoxicity activities had moderate cytotoxicity.

Keywords: Breast cancer, T472 cell line, Anticancer, IC₅₀, MTT method, *Petrosia* sp.

1. PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker dengan jumlah kejadian tertinggi pada perempuan dan dapat menyebabkan kematian bagi perempuan di seluruh dunia. Berdasarkan data *American Cancer Society* pada tahun 2019 lebih dari 41.000 perempuan meninggal akibat kanker payudara. Didukung dengan data *World Health Organization (WHO)* yang mengatakan kejadian kanker payudara paling banyak terjadi di Indonesia dengan jumlah kasus 65.858 dari total 396.914 kasus kanker ([WHO, 2020](#))

Kemoterapi masih menjadi terapi pengobatan pada penderita kanker utamanya kanker payudara. Jenis pengobatan kemoterapi yang diberikan tergantung pada jenis, lokasi stadium dan penyebaran sel kanker serta kondisi kesehatan penderita kanker. Efek samping yang ditimbulkan selama kemoterapi dapat terjadi dari efek samping ringan hingga berat. Toksisitas pada hematologi menyebabkan efek samping berupa anemia, neutropenia, dan trombositopenia. Berdasarkan hal tersebut maka banyak dilakukan pengembangan pengobatan modern untuk agen antikanker dengan menggunakan bahan alam. Pengembangan tersebut menjadi prioritas karena biaya pengobatan kanker yang tinggi, yang juga berbanding lurus dengan efek samping yang diberikan ([Darmawan dkk., 2019](#); [Ambarwati & Erlinda, 2014](#)).

Spons *Petrosia* sp. adalah biota laut yang berpotensi sebagai antikanker karena memiliki aktivitas sitotoksik. Spons ini dikenal mengandung metabolit sekunder seperti steroid, alkaloid, poliketida, terpenoid, dan poliasetilen. Senyawa ini memiliki efek farmakologis yang menarik seperti antiinflamasi, antineoplastik dan sitotoksik ([Pailee dkk., 2017](#)). Spons ini memiliki ciri-ciri struktur besar, bentuk tak beraturan dan memiliki osula yang jelas. Menurut Pailee dkk. (2017), isolasi spons laut *Petrosia* sp. menghasilkan 8 sterol yang memiliki efek sitotoksik pada lini sel kanker. Senyawa sitotoksik dapat dikembangkan menjadi agen sitotoksik, yang nantinya dapat diarahkan menjadi senyawa antikanker, dan sebagainya ([Apriyandi & Yuni, 2019](#); [Haedar dkk., 2016](#); [Abdel-Lateff dkk., 2017](#); [Pailee dkk., 2017](#); [Handayani dkk., 2012](#)).

Lini sel T47D banyak digunakan dalam pengujian sitotoksik senyawa antikanker. Lini sel T47D termasuk dalam subtipe luminal A yang merupakan subtipe dengan angka kejadian 50-60% dari populasi penderita kanker payudara. Lini sel ini sering digunakan dalam penelitian uji sitotoksitas karena kemudahan dalam penanganan sel kultur, kemampuan replikasi baik dan homogenitas yang baik ([Bols dkk., 2011](#); [Setiawan dkk., 2016](#); [Pertiwi, 2020](#)). Salah satu metode uji sitotoksik yang paling sering digunakan adalah metode MTT (mikrotetrazolium). Metode MTT adalah uji kolorimetri yang sensitif, kuantitatif, dan andal yang mengukur proliferasi dan viabilitas sel. Pengujian ini didasarkan pada kapasitas enzim mitokondria dehidrogenase dalam sel hidup untuk mengubah substrat kuning yang larut dalam air menjadi produk formazan biru tua yang tidak larut dalam air. Di antara semua jenis uji sitotoksik, MTT memberikan teknik yang aman, nyaman, dan murah dengan banyak aplikasi dalam penyelidikan dan klinik ([Molae dkk., 2017](#)). Oleh karena itu, penelitian untuk mengkaji aktivitas dari spons laut *Petrosia* sp. sangat penting untuk dikembangkan, terutama pada lini sel kanker payudara.

2. METODE

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah pipet mikro, mikroskop, inkubator CO₂, ELISA reader, hemasitometer, sentrifuse, conical tube 15 mL, 96 well plate, batang pengaduk, gelas kimia 100 mL dan 1000 mL, *hotplate*, labu takar (10 mL dan 100 mL), *magnetik stirer*, pipet tetes, sarung

tangan, spatula, timbangan analitik, toples, gegep kayu, rak tabung, *rotary vacuum evaporator*, tabung reaksi, botol duran 1000 mL, vial, dan vortex.

Bahan yang digunakan adalah sampel spons laut *Petrosia* sp., aquades, aquabidessilata steril, aluminium foil, asam format, asetonitril, etanol 96 %, DMSO pro culture, media kultur lengkap RPMI 1640, PBS, MTT, SDS, Tripsin-EDTA, FBS, triptan blue, FeCl₃, asam sulfat, asam klorida, kloroform, logam magnesium, natrium bikarbonat, natrium hidroksida, reagen Dragendorf, reagen Mayer, 5-Fluorourasil (5-Fu), masker, dan handskun.

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu spons laut *Petrosia* sp. diperoleh dari Taman Pendidikan Laut Bintang Samudra Kecamatan Soropia, Kabupaten Konawe, Provinsi Sulawesi Tenggara. Spons *Petrosia* sp. kemudian dipotong kecil-kecil lalu direndam menggunakan air es untuk mengendapkan dan mengurangi kadar garam yang terdapat dalam spons *Petrosia* sp., setelah itu dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan 3×24 jam di dalam wadah yang tertutup. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dan dipekatkan kembali dengan tangas air sampai diperoleh ekstrak kental.

Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol *Petrosia* sp.

Skrining fitokimia yang dilakukan adalah pengujian secara kualitatif terhadap senyawa kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol *Petrosia* sp. Uji kandungan senyawa flavonoid dilakukan dengan cara penambahan HCl pekat, kemudian ditambahkan 0,2 mg serbuk. Uji kandungan senyawa alkaloid dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf. Uji kandungan senyawa saponin dilakukan dengan cara ditambahkan HCl 2 N (Wahyuni dkk., 2019). Uji kandungan senyawa tanin dilakukan dengan cara ditambahkan 1 mL FeCl₃ 1% (Adjeng dkk., 2020). Uji kandungan senyawa steroid dan terpenoid dilakukan dengan cara penamahan 2 mL kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard.

Uji Sitotoksik

Preparasi sel dilakukan dengan tahapan panen sel, perhitungan sel kanker, perletakan sel pada 96-well plate, pemberian larutan sampel pada 96-well plate, dan penyiapan reagen MTT, sertaperhitungan viabilitas sel. Uji sitotoksitas secara *in vitro* dilakukan dengan metode MTT (*reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide*). Suspensi sel dalam media lengkap sebanyak 100µL ke setiap sumuran (termasuk kontrol media) sehingga didapatkan kadar akhir sampel dengan variasi kadar 25, 50, 100, 200, 500, 1000 dan 2000 ppm. Lalu diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C/5%CO₂ (sampai terbentuk kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru). Apabila kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop inverted, lalu ditambahkan stopper SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,1 N HCl, dibungkus plate dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam. Pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA reader untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap ekstrak pada panjang gelombang 550-600 nm (595 nm).

Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan data yang dimasukkan merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan persentase sel hidup serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya, dilakukan analisis regresi linear menggunakan *software* GraphPad versi 5 yang akan memunculkan nilai IC₅₀ dari sampel dan bentuk grafik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Ekstrak

Jumlah rendamen yang dihasilkan adalah 2,94% dari 274,7 g ekstrak kental *Petrosia* sp. (Tabel 1). Nilai rendamen ekstrak menunjukkan banyaknya ekstrak yang dapat diperoleh dari sejumlah sampel spons laut *Petrosia* sp. Perhitungan rendamen bertujuan untuk mengetahui kesetaraan ekstrak kental setiap gram dengan sampel.

Tabel 1. Karakteristik Ekstrak Etanol *Petrosia* sp.

Sampel	Pelarut (L)	Warna Filtrat	Warna Ekstrak Kental	Berat Sampel (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendamen % (b/b)
Spons laut <i>Petrosia</i> sp.	Etanol 96 % (±) L	Kuning Bening	Coklat Kehitaman	1.900 g	274,7 g	2,94 %

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan penambahan reagen yang bertujuan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu bahan alam secara kualitatif (Tabel 2). Skrining fitokimia adalah langkah awal untuk mengeksplorasi kandungan kimia suatu bahan alam untuk menemukan obat baru berdasarkan hasil uji kualitatif yang terkandung dalam ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. Hasil uji kualitatif ekstrak etanol *Petrosia* sp. menunjukkan kandungan senyawa alkaloid dengan adanya pembentukan endapan merah jingga. Endapan tersebut mengandung kalium alkaloid berdasarkan pembentukan kompleks kalium alkaloid karena kemampuan alkaloid yang membentuk ikatan kovalen dengan kalium. Ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. mengandung senyawa flavonoid berdasarkan pembentukan garam flavilium berwarna merah atau jingga yang dihasilkan dari kemampuan serbuk magnesium dan HCl pekat mereduksi ikatan glikosida dengan flavonoid pada bagian benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid. Identifikasi senyawa steroid pada ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. menunjukkan terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi kehijauan gelap yang menunjukkan kemampuan steroid untuk membentuk warna dengan asam sulfat pekat (Dewi dkk., 2013). Identifikasi kimia dengan menggunakan FeCl₃ menunjukkan ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. mengandung tanin yang ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman atau biru tua setelah penambahan FeCl₃ karena kemampuan tanin membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe³⁺. Identifikasi kimia dengan penambahan HCl pada ekstrak etanol spons laut *Petrosia* sp. menunjukkan terjadinya pembentukan buih/busa yang stabil pada ekstrak karena senyawa saponin mengandung senyawa yang sebagian larut dalam air (hidrofilik) dan senyawa yang larut dalam pelarut nonpolar (hidrofobik) sebagai surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan, sehingga saat dikocok gugus hidrofobik akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih (Dewi dkk., 2013).

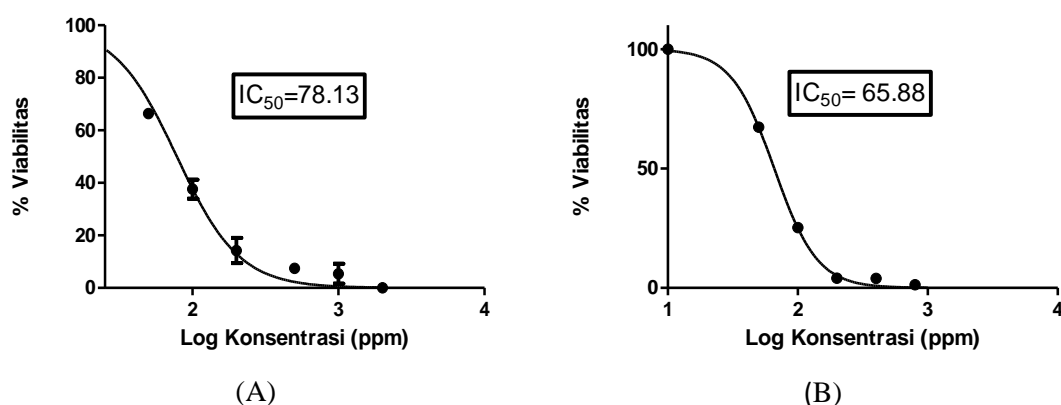
Tabel 2. Uji Kualitatif Ekstrak Etanol *Petrosia* sp.

Uji kimia	Pereaksi	Hasil	Kesimpulan
Tanin	FeCl ₃ 1 %	Perubahan warna menjadi hijau kehitaman	Positif
Steroid	Kloroform+ Lieberman-Burchard	Terbentuk warna ungu/biru	Positif
Saponin	HCl 2 N	Terbentuk busa	Positif
Flavonoid	Mg + HCl Pekat	Terbentuk warna merah-kejinggaan	Positif
Alkaloid	Dragendorff Mayer	Terbentuk endapan merah jingga Terbentuk endapan putih	Positif

Uji Sitotoksik dengan Mikrotetrazolium

Perhitungan viabilitas sel bertujuan untuk mengetahui jumlah sel hidup yang diperoleh. Syarat perhitungan sel untuk uji sitotoksik metode MTT adalah 5×10^4 sel/well dan sel yang dihitung tidak boleh dalam keadaan menggerombol yang menggambarkan kemampuan sel untuk hidup (viabilitas sel). Berdasarkan hasil absorbansi yang didapatkan nilai absorbansi kontrol sel yaitu 0.963 sehingga pemberian ekstrak etanol *Petrosia* sp. mempengaruhi pertumbuhan terhadap lini sel T47D.

Hasil dari uji MTT berupa absorbansi yang dapat digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀. Kriteria yang digunakan untuk mengkategorikan sitotoksitas berdasarkan *National Cancer Institute* (NCI). Berdasarkan kriteria NCI, IC₅₀ ≤ 20 µg / ml adalah sangat sitotoksik, IC₅₀ berkisar antara 21 dan 200 µg/mL bersifat sitotoksik sedang, IC₅₀ berkisar antara 201 dan 500 µg/mL bersifat sitotoksik lemah dan IC₅₀ > 501 µg/mL adalah tidak ada sitotoksitas (Sajjadi dkk., 2015). Nilai IC₅₀ ekstrak etanol *Petrosia* sp. adalah 78,13 µg/ml sedangkan untuk 5-FU adalah 65,88 µg/ml (gambar 1A dan 1B). Hal tersebut menunjukkan bahwa keduanya memiliki sitotoksik yang sedang (moderate sitotoksik) pada lini sel kanker payudara T47D. Menurut [Suzery dan Cahyono \(2014\)](#) nilai IC₅₀ dibawah 100 µg/ml maka diindikasikan memiliki potensi sebagai agen kemopreventif.



Gambar 1. Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT(A) Ekstrak Etanol *Petrosia* sp. (B)Kontrol Positif (5-FU)

Perbedaan potensi ketoksikan suatu sampel didasarkan pada kandungan senyawa yang terdapat pada sampel tersebut. [Padmasari \(2013\)](#) mengatakan ekstrak etanol adalah pelarut yang

mampu menarik senyawa polar maupun nonpolar, dengan indeks polaritas sebesar 5,2. Menurut identifikasi kandungan kimia, ekstrak etanol *Petrosia* sp. memiliki metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin. Senyawa metabolit sekunder yang dapat larut dalam pelarut non polar yaitu steroid. Senyawa yang bersifat semi polar yaitu senyawa golongan fenolik termasuk flavonoid, sedangkan senyawa bersifat polar yaitu alkaloid, saponin, dan tanin (Padmasari dkk., 2013). Senyawa steroid yang diduga memiliki aktivitas antikanker adalah spinasterol. Spinasterol mampu menyebabkan penurunan regulasi ekspresi gen dari siklus cdk4 dan cdk6, apoptosis dan penekanan tumor pada p53, BRCA-1 dan BRCA-2. Spinasterol juga mampu mengganggu aktivitas pada siklus sel, dengan penghentian siklus G1 ke ekspresi berlebih dari p53 dan penurunan regulasi gen cdk4 dan cdk6 dalam sel yang diobati dengan spinasterol. Cdk4 dan Cdk6 adalah kinase serin-treonin yang bergantung pada siklin yang bertugas menerima stimulus untuk mempromosikan transkripsi gen yang dibutuhkan untuk siklus sel fase G1 hingga perkembangan pada fase S sehingga berpengaruh pada proliferasi sel (Sedky dkk., 2018). Senyawa spinasterol memiliki efek antiproliferatif yang kuat terhadap kanker payudara (Sagrero dkk., 2017).

4. KESIMPULAN

Ekstrak etanol *Petrosia* sp. memiliki kandungan kimia alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan tanin. Ekstrak etanol *Petrosia* sp. dapat dilanjutkan pada tahapan uji sitotoksik dengan menggunakan metode MTT karena kemampuan ekstrak etanol *Petrosia* sp. yang dapat mempengaruhi pertumbuhan lini sel T47D kanker payudara. Berdasarkan analisis data, diperoleh ekstrak etanol *Petrosia* sp. memiliki sifat sitotoksik sedang berdasarkan kriteria NCI.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo atas fasilitas yang sudah diberikan.

6. KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan

7. DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Lateff, A., Alarif, W.M., Al-Lihaibi, S.S., Abdel-Naim, A.B. (2017). Antiproliferative Effects of Selected Marine Organisms Collected from Red Sea. *Pak J Pharm Sci*, 30(2), 381-386.
- Adjeng, A. N. T., Hairah, S., Herman, S., Ruslin, R., Fitrawan, L. O. M., Sartinah, A., Ali, N. F. M., Sabarudin, S. (2020). Skrining Fitokimia dan Evaluasi Sediaan Sabun Cair Ekstrak Etanol 96% Kulit Buah Salak Pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.) Sebagai Antioksidan. *Pharmauho: Jurnal Farmasi, Sains, Dan Kesehatan*, 5(2), 3-6.
- Ambarwati, Erlinda K W. (2014). Efek Samping Kemoterapi Secara Fisik Pasien Penderita Kanker Serviks. *Jurnal dan Prosiding Nasional Unismuh*. American Cancer Society. (2019). *Breast Cancer Basic Facts & Figures 2019-2020*. American Cancer Society.
- Apriyandri, R. A & Yuni E. (2019). Artikel Ulasan: Aktivitas Kandungan Senyawa Dan Karakteristik Spons Laut Genus *Petrosia*, *Farmaka*.17(2). 285-295.
- Bols A., Kawano L.E.J., Lee. (2011). December 2011. Cellular, Molecular, Genomics, And Biomedical Approaches Culture of Fish Cell Lines. *Encyclopedia of Fish*.
- Darmawan, Reina M., Budi R. (2019). Gambaran Hubungan Regimen Dosis dan Efek Samping Kemoterapi pada Pasien Kanker di RSUD Prof. Dr. Margono Soekarjo Purwokerto Periode Bulan Januari-Februari Tahun 2019. *Majalah Farmasetik*, 15(20), 113-121.

- Dewi, D.A.D.Y, Astuti, K.W, Warditiani, N.K. (2013). Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal OJS Unud*
- Haedar, Baru S., Ratna D.P. (2016). Potensi Keanekaragaman Jenis Dan Sebaran Spons Di Perairan Pulau Saponda Laut Kabupaten Konawe. *Sapa Laut*,1(1), 1-9.
- Handayani, D., Mega, Y., Yohanes, A., dan Nicole J. de. Voogd. (2012). Isolasi Senyawa Sitotoksik Dari Spons Laut *Petrosia* sp. *JPB Perikanan*, 7(1), 69-76.
- Molaeae, N., Ghasem, M., Abbas, P., Mostafa, E., Ali, G. (2017). Evaluating the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using MTT Assay. *International Journal of Basic Science In Medicine*, 2(1), 25-28.
- Padmasari, P.D., Astuti, K.W., Warditiani, N.K. (2013). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana*, 2(4), 1-7.
- Pailee, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Prachywarakorn, V. (2017). Sterols from Thai Marine Sponge *Petrosia* (*Strongylophora*) sp., and Their Cytotoxicity. *Marine Drugs*, 15(3), 54-61.
- Pertiwi, Dessy, A., Linosefa. (2020). Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47D Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 9(15), 165-168.
- Pratama, Rina, F. N. (2018). Review: Senyawa Aktif Antikanker Dari Bahan Alam Dan Aktivitasnya. *Farmaka*, 16(1), 30-36.
- Sagrero, A., Moisés, N., Eduardo, R.B., Carmen, L.Z., Manuel, J.E., Ramón, E.R.Z. (2017). Antiproliferative activity of spinasterol isolated of *Stegnosperma halimifolium* (Benth, 1844). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1137-1143.
- Sajjadi, S. E., Mustafa, G., Mehrangiz, H., Leili, M. (2015). Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 15-19.
- Sedky, N. K., El Gammal, Z. H., Wahba, A. E., Mosad, E., Waly, Z. Y., El-Fallal, A. A., Arafa, R. K., & El-Badri, N. (2018). The molecular basis of cytotoxicity of α -spinasterol from *Ganoderma resinaceum*: Induction of apoptosis and overexpression of p53 in breast and ovarian cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry*, 119(5), 3892–3902.
- Setiawan, Elvi, R.P.W., Ary, K. (2016). Sitotoksitas Fraksi Nonpolar *Brucea javanica* (L.) Merr. Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Penelitian Sains*, 18(3), 111-115.
- Suzery, M., & Cahyono, B. (2014). Evaluation of Cytotoxicity Effect of *Hyptis pectinata* Poit (Lamiaceae) extracts using BSLT and MTT Methods. *Jurnal Sains Dan Matematika*, 22(3), 84-88.
- Wahyuni., Yusuf. M. I., Malik. F., Lubis. A. F., Indalifiany. A., Sahidin. I. (2019). Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Melophlus sarasinorum* Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Pada Mencit Jantan Balb/C. *Jurnal Farmasi Galenika: Galenika Journal of Pharmacy*, 5(2), 147-157.
- World Health Organization. 2020. Cancer Country Profiles 2020. Retrieved April 6, 2021, from https://www.who.int/cancer/country-profiles/IDN_2020.pdf?ua=1.