

Penentuan Aktivitas Antikanker Fraksi Etil Asetat Daun Bandotan (*ageratum conyzoides* linn.) Terhadap Cell Line Kanker Kolon WiDr

Linda Ayu Lusiantika^{1*}, Esti Wahyu Widowati², Miranda Adihimawati³

^{1,2,3}Linda Ayu Lusiantika, Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga, Jl. Marsda Adisucipto, Yogyakarta 55281

*ayu.lusiantika@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi, dan uji antikanker secara *in vitro* terhadap *cell line* kanker kolon WiDr pada daun *Ageratum conyzoides* Linn. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antikanker dengan metode microtetrazolium (MTT assay). Metode yang digunakan yaitu ekstraksi metabolit sekunder menggunakan maserasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan etanol, dilanjutkan dengan KLT. *Crude extract* hasil maserasi yang memiliki rendemen tertinggi dipilih dan dipisahkan dengan fraksi-fraksinya menggunakan KKV. Fraksi-fraksi dengan berat terbesar dipilih untuk diuji aktivitas antikanker terhadap *cell line* WiDr dengan MTT assay. Skrining fitokimia dan identifikasi senyawa dengan GC-MS dilakukan pada fraksi yang memiliki nilai IC_{50} terendah. Hasil maserasi menunjukkan bahwa *crude extract* etil asetat memiliki jumlah rendemen tertinggi sebesar 7,31 % dan memiliki pemisahan terbaik hasil KLT ditandai dengan jumlah noda terbanyak. Pemisahan dengan KKV menghasilkan 21 fraksi, 4 fraksi yang dipilih berdasarkan berat terbesar yaitu fraksi 6, 13, 14 dan 15. Uji aktivitas antikanker dengan konsentrasi 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ menunjukkan fraksi 6 memiliki nilai IC_{50} terendah yaitu 251,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Berdasarkan hal tersebut, fraksi 6 memiliki aktivitas yang rendah sebagai senyawa antikanker. Meskipun, skrining fitokimia menunjukkan golongan alkaloid dan terpenoid serta hasil identifikasi dengan GC-MS mengindikasikan adanya senyawa *2H-benzopyran* dan *neophytadiene*

Kata Kunci: *Ageratum conyzoides* Linn; Kromatografi Kolom Vakum; Antikanker; Skrining Fitokimia, GC-MS.

ABSTRACT

A research to test the anticancer activity of *in vitro* anticancer activity against colon cancer cell line WiDr *Ageratum conyzoides* Linn.leafs. The aims of this study are to determine anticancer activity using MTT method. The method used is the extraction of secondary metabolites using maceration with *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol, followed by TLC. Crude extract maceration results that have the highest yield selected and separated by fractions using KKV. Fractions with the greatest weight was chosen to be tested anticancer activity against WiDr cell line by MTT assay. Phytochemical screening and identification of compounds by GC-MS carried out on the fraction which has the lowest IC_{50} value. Maceration results showed that crude ethyl acetate extract had the highest amount of yield at 7.31% and has the best separation

results of TLC is characterized by the highest number of stains. Separation by KKV produce 21 fractions, 4 fractions were selected based on the weight of the total of the fraction 6, 13, 14 and 15. Test anticancer activity with a concentration of 62.5; 125; 250; 500 and 1000 mg mL⁻¹ shows the fraction 6 has the lowest IC₅₀ value is 251.48 mg mL⁻¹. Based on this, the fraction 6 has low anticancer activity. Although, the phytochemical screening showed alkaloids and terpenoids as well as the result of identification with GC-MS indicated the presence of compounds 2Hbenzopyran and neophytadiene.

Keywords: *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves; Column Chromatography Vacuum; anticancer; phytochemical, GC-MS.

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh perubahan sifat dari sel normal yang pembelahannya tidak terkendali. beberapa jenis kanker yang ada di Indonesia, kanker kolon masuk pada urutan ke-10 (2,75%) setelah kanker rahim, payudara, kelenjar getah bening, kulit, nasofaring, ovarium, *rectum*, jaringan lunak, dan tiroid (Haryanto, 2009). Kanker kolon disebut juga kanker kolorektal yang merupakan salah satu jenis kanker ganas yang tumbuh pada permukaan usus besar (kolon) atau anus (*rectum*) (Cassidy, dkk., 2006).

Beberapa metode pengobatan kanker yang banyak digunakan saat ini adalah metode operasi, radiasi, kemoterapi, dan metode imunoterapi (Foye, 1996). Pada dasarnya metode-metode tersebut bertujuan untuk mengangkat jaringan kanker atau mematikan sel kanker dan memberikan efek samping. Berdasarkan hal tersebut, pengembangan metode pengobatan antikanker dengan efek samping yang relatif lebih kecil perlu dilakukan.

Agen antikanker dari bahan alam mampu mengobati pada sumber penyakit dengan memperbaiki sel-sel, jaringan, dan organ tubuh yang rusak dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Berbagai metode pengobatan kanker terus dikembangkan saat ini, salah satunya

dengan mengeksplorasi bahan alam sebagai agen antikanker. Bahkan apabila penggunaannya tepat, agen antikanker dari bahan alam kemungkinan tidak memberikan efek samping sehingga dapat dicerna oleh tubuh (Harvey, 2008). Agen antikanker memiliki toksisitas selektif yaitu mampu menghambat sel kanker tanpa merusak sel normal Rahmawati, dkk., 2008).

Melihat potensi keragaman bahan alam di Indonesia, salah satu bahan alam yang diperkirakan mempunyai aktivitas sebagai agen antikanker adalah Bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.). Bandotan merupakan tanaman Indonesia yang dapat tumbuh di daerah yang beriklim tropis dan subtropis. Bandotan dapat berkhasiat sebagai obat malaria, rematik, kejang, luka bakar, radang, pendarahan rahim, diare, tumor, kanker dan sebagainya (Pamilih, 2009).

Berbagai penelitian tentang herba Bandotan sebelumnya telah dilakukan salah satunya menggunakan ekstrak etanol namun tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa, dibuktikan dengan nilai IC₅₀ yang dihasilkan yaitu sebesar 855 µg mL⁻¹ Rahmawati, dkk., 2008). Uji sitotoksitas menggunakan ekstrak etil asetat herba Bandotan telah dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dan hasilnya menunjukkan bahwa herba Bandotan tidak memiliki efek sitotoksitas. Hal ini, dibuktikan dengan jumlah sel hidup > 50 %

yaitu sebesar 86,50 % sehingga nilai IC₅₀ tidak dapat dihitung Delimartha, 2000.

Berdasarkan hal tersebut, sangat menarik apabila pemanfaatan daun Bantotan sebagai agen antikanker dikembangkan lebih lanjut dengan menggunakan sel kanker lainnya, bagian simplisia dan penyari metabolit sekunder yang berbeda untuk mengetahui efek antikanker. Oleh karena itu, dilakukan penelitian terhadap sel kanker kolon WiDr dengan penyari etil asetat untuk mengetahui apakah fraksi hasil pemisahan daun Bantotan memiliki aktivitas antikanker terhadap *cell line* kanker kolon WiDr dengan menggunakan metode MTT *assay* serta diketahui profil metabolit sekunder yang dihasilkannya.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian bahan teknis yaitu *n*-heksana, etil asetat dan etanol, *n*-heksana (C₆H₁₄) (*p.a*) Merck, etanol 96% (C₂H₆O) Merck, etil asetat (C₄H₈O₂) (*p.a*) Merck, silika gel 60 GF 254, silika gel 60 F 254 Merck, *cell line* WiDr koleksi laboratorium Parasitologi UGM, media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640), *fetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v), akuades, *dimethyl sulfoxide* (DMSO) Merck, *reagen stopper* (natrium dodesil sulfat 10% dalam HCl), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5 mg mL⁻¹ dalam FBS dan tripsin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, oven listrik, blender, maserator, neraca analitik (Sartorius BP 160 P), seperangkat alat gelas, Kolom Vakum (IWAKI), mikropipet (Gibson),

tabung *conical steril*, *microplate 96-well* (IWAKI), *ELISA reader (Benchmark)*, *vacuum rotary evaporator (Heidolph-Labora 4000 efficient)*, *falcon flask*, vortex (Tropmed), inkubator 37°C 5% CO₂ (Heraeus), lemari es, *laminar air flow* (LABCONCO *Purfer Class II Biosafety Cabinet*), tangki nitrogen cair, *tissue culture flask*, bilik hitung, dan mikroskop *inverted* (OLYMPUS), satu set alat GC-MS (Agilent GC 6890N 5975 B MSD).

Metode Isolasi Metabolit Sekunder

Sebanyak 350 g sampel daun *Ageratum conyzoides* Linn. yang telah dihaluskan, dimaserasi menggunakan pelarut organik dengan tingkat kepolaran berbeda, yaitu *n*-heksana, etil asetat dan etanol. Hasil maserasi dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak *n*heksana, etil asetat dan etanol kemudian dilihat pemisahan terbaik dengan KLT. Ekstrak yang akan diteruskan selanjutnya adalah ekstrak etil asetat.

Pemisahan ekstrak etil asetat dilanjutkan dengan Kromatografi Kolom Vakum (KKV) menggunakan variasi eluen *n*heksana:etil asetat (3:1), *n*-heksana:etil asetat (1:3), *n*-heksana:etil asetat (3:2), *n*-heksana:etil asetat (2;3), etil asetat:etanol (1:3), etil asetat:etanol (3:1), etil asetat:etanol (2:3), etil asetat:etanol (3:2), etil asetat 100 %, etil asetat 100 % dan etanol 100 %. Fraksi hasil pemisahan ditampung setiap 50 mL, sehingga diperoleh 21 fraksi. Fraksi - fraksi tersebut dilanjutkan ke tahap profiling KLT. Hasil profiling dipilih empat fraksi yaitu F6, F13, F14 dan F15 dilanjutkan untuk uji antikanker dengan metode MTT.

Uji Antikanker dengan MTT

Sel didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ agar sel beradaptasi

dan menempel di sumuran. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100 µL media RPMI 1640 yang mengandung sampel dengan variasi konsentrasi 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 µL mL⁻¹, diinkubasi kembali selama 48 jam.

Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100 µL FBS. Kemudian ditambahkan 100 µL media kultur yang mengandung MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37 °C ke dalam masing-masing sumuran. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Setelah 4 jam, pada tiap sumuran ditambahkan reagen stopper untuk membunuh sel dan melarutkan kristal formazan, kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (Peng dan Zhao, 2009).

Data yang diperoleh berupa absorbansi dari masing-masing sumuran dikonversi ke dalam % sel hidup dan dianalisis menggunakan rumus:

$$\frac{Abs\ perlakuan - Abs\ media}{Abs\ kontrol - Abs\ media} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan perhitungan menggunakan persamaan garis hubungan log konsentrasi terhadap prosentase sel hidup (Mursyidi, 1985). **Skrining Fitokimia**

Fraksi potensial diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan uji fitokimia. Uji fitokimia dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi pendeteksi golongan senyawa (Cannell, 1998).

Identifikasi dengan GC-MS

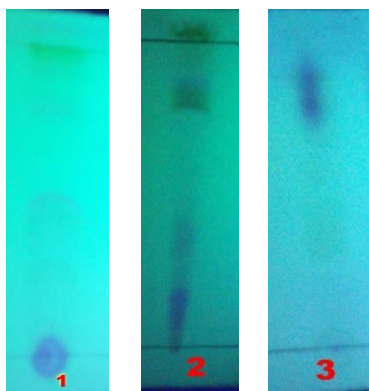
Fraksi potensial yang sudah diuji antikanker dan uji fitokimia diidentifikasi senyawanya menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa agilent GC 6890N 5975B MSD. Eluen berupa gas helium (He) dengan tekanan 8,67 psi⁻¹, aliran total 13,7 mL menit⁻¹. Rentang suhu pada oven yaitu 70°-325°C dengan mode *splitless*. Kolom yang digunakan yaitu kolom kapiler (Agilent 19091S-433) berisi fase diam berupa HP-5MS 5 % fenil metil siloksan dengan suhu maksimal kolom 325°C panjang 30 m, diameter 250 µm. Mode aliran gas pembawa dan komponen yang dipisahkan 1 mL menit⁻¹, tekanan 8,68 psi dan kecepatan rata-rata 37 cm detik⁻¹. Senyawa yang terpisahkan dalam kolom kemudian masuk ke detektor yang MS. Senyawa dianalisis menggunakan *electron impact* (EI) pada rentang massa antara 30 hingga 600 m/z⁻¹ dan dihasilkan fragmen massa spektra yang kemudian dibandingkan dengan spektra massa standar *library* (Wiley7Nist05.L.) berdasarkan *similarity index* (SI) (Pavia, dkk., 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi metabolit sekunder yang terkandung dalam daun Bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) dilakukan menggunakan metode ekstraksi, yaitu melalui proses maserasi. Maserasi ini dipilih karena memiliki keuntungan yaitu menggunakan peralatan sederhana, lebih mudah jika dibandingkan dengan metode lain dan untuk mencegah terjadinya kerusakan pada senyawa yang tidak tahan panas, sehingga senyawa-senyawa yang terkandung dalam suatu ekstrak biasanya cenderung tidak stabil pada suhu tinggi sehingga pemanasan dalam suhu tinggi

dihindari untuk mencegah dekomposisi senyawa tersebut.

Hasil isolasi metabolit sekunder didapatkan rendemen *crude extract* *Ageratum conyzoides* Linn. terbesar diperoleh yaitu pelarut etil asetat sebesar 7,31 % diikuti oleh etanol (7,20 %) dan *n*-heksana (6,32 %) yang selanjutnya di KLT untuk diketahui pemisahan serta banyaknya spot yang dihasilkan.

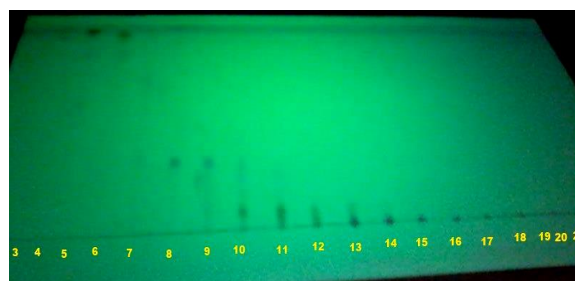


Gambar 1. KLT hasil pemisahan *crude extract* *n*-heksana (1), etil asetat (2), dan etanol (3) daun Bandotan

Berdasarkan **Gambar 1**, dapat dilihat bahwa pemisahan terbaik dapat diamati *crude extract* etil asetat. Hal ini ditunjukkan dengan jumlah noda yang banyak serta jarak noda yang tidak berdekatan satu sama lain. Sehingga ekstrak etil asetat dipilih untuk fraksinasi lebih lanjut dengan KKV. Pada penelitian ini, tidak semua fraksi etil asetat dapat diujikan, karena untuk analisis sampel perlu mempertimbangkan faktor kuantitas fraksi yang dihasilkan dan jumlah spot hasil *profiling* dengan KLT. Fraksi-fraksi dengan jumlah yang relatif sedikit sebaiknya tidak dilanjutkan untuk analisis. Warna fraksi yang dihasilkan juga perlu dipertimbangkan, karena warna fraksi dapat menjadi gambaran jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi tersebut. Fraksi yang berwarna

kuning mengindikasikan adanya golongan senyawa flavonoid (Freshney, 2000).

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang telah diketahui berguna dalam bidang farmakologi karena potensi bioaktivitasnya sebagai antikanker (Sukadana, 2010). Kemampuan flavonoid sebagai antikanker karena adanya gugus hidroksi yang tersubstitusi pada flavonoid, adanya rantai samping gugus prenil, dan terjadi resonansi. Berdasarkan hal tersebut, dari 21 fraksi hasil KKV maka dipilih empat fraksi yaitu fraksi 6, 13, 14 dan fraksi 15 yang selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas antikanker sehingga dapat diketahui fraksi yang potensial.



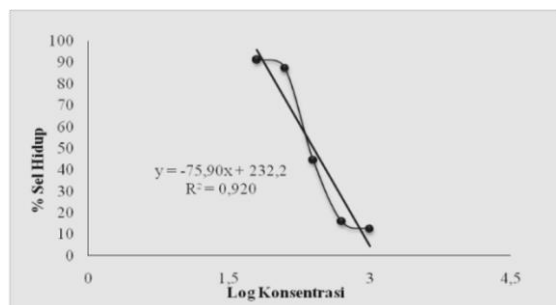
Gambar 2 KLT extract etil asetat setelah dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom vakum (KKV)

Hasil uji antikanker dengan MTT terhadap empat fraksi menunjukkan bahwa fraksi 6 etil asetat *Ageratum conyzoides* Linn. Memiliki nilai IC_{50} terkecil sebesar $251.48 \mu\text{g mL}^{-1}$. Metode MTT digunakan untuk mengetahui jumlah sel hidup pada sampel. Reaksi MTT dapat menghasilkan formazan berwarna ungu yang mengindikasikan banyaknya sel yang hidup. Semakin banyak kristal formazan maka semakin besar intensitas warna ungu yang tampak. Reaksi dengan MTT kemudian dihentikan dengan *stopper reagent* (*Sodium Dodecyl Sulphate*). Intensitas warna yang muncul dideteksi menggunakan ELISA

reader λ 595 nm (Feri, 2003). Besar kecilnya absorbansi yang teramati memberikan gambaran banyak sedikitnya *cell line* WiDr yang bertahan hidup. Semakin kecil nilai absorbansi maka semakin berkurang warna ungu yang terbentuk. Sehingga, tingkat ketoksikan sampel semakin tinggi terhadap *cell line* kanker kolon WiDr.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ fraksi hasil pemisahan *crude extract* etil asetat *Ageratum conyzoides* Linn. terhadap *cell line* kanker kolon WiDr

Fraksi	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
6	251,48
13	6068,28
14	295,70
15	314,28



Gambar 3. Hubungan log konsentrasi dengan prosentase sel hidup fraksi 6 etil asetat daun Bandotan.

Skrining fitokimia telah dilakukan menggunakan pereaksi-pereaksi yang khas karena metode ini cukup sederhana untuk menentukan metabolit sekunder dalam sampel dan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak adanya warna kuning yaitu ketika pereaksi FeCl₃ dan pereaksi sitroborat diaplikasikan. Hal ini kemungkinan karena fraksi etil asetat merupakan jenis senyawa semi polar sehingga senyawa yang tertarik oleh fraksi etil asetat bisa senyawa non polar atau senyawa polar. Namun, untuk uji terpenoid fraksi 6 etil asetat didapatkan hasil

positif, yang ditandai dengan adanya warna biru dan nilai Rf sebesar 0,212. Selain itu, hasil positif mengandung senyawa alkaloid dengan nilai Rf sebesar 0,875 dan adanya warna coklat saat diaplikasikan.

Tabel 4. Hasil skrining terhadap fraksi 6 etil asetat daun *Ageratum conyzoides* Linn. menggunakan KLT dengan fasa diam

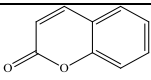

Metabolit Sekunder	Pereaksi	Ket
Alkaloid	Dragendorf	+
Terpenoid	Anisaldehyd asam sulfat	+
Flavonoid	Sitroborat	-
Fenolik	FeCl ₃	-

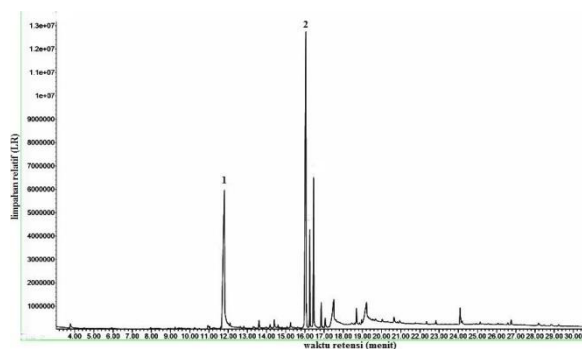
Berdasarkan hal tersebut, senyawa yang diduga terkandung dan memiliki aktivitas antikanker terhadap *cell line* kanker kolon WiDr dalam fraksi 6 etil asetat *Ageratum conyzoides* Linn. yaitu golongan terpenoid dan alkaloid. Senyawa terpenoid mempunyai kemampuan untuk memblokir siklus sel pada fase G2/M dengan cara menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga proses mitosis akan terhambat. Begitupula dengan senyawa alkaloid merupakan senyawa yang berperan penting dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker, seperti senyawa vinkristin dan vinblastin yang merupakan senyawa golongan alkaloid vinka. Senyawa tersebut berperan sebagai *antimitotic agent* dengan mengikat dimer tubulin yang mengganggu munculnya mikrotubul dan dapat menghancurkan benang spindel sehingga pembelahan sel dapat terhenti pada saat metafase Meiyanto, dkk., 2008. Identifikasi senyawa lebih lanjut dilakukan dengan instrumen GC-MS.

Berdasarkan analisis kromatogram GC, terdapat 2 puncak dominan yang muncul dengan waktu retensi yang berbeda-

beda bergantung waktu yang dibutuhkan oleh suatu senyawa untuk berubah menjadi fasa gas nya. Hasil analisis spektra massa menunjukkan bahwa 2 puncak dominan dengan prosentase senyawa dalam sampel yaitu senyawa *2H-1-benzopyran-2-one* sebesar 25,40 % dan *neophytadiene* sebesar 32,88 %.

Tabel 5. Hasil analisa spektra massa dari fraksi 6 *crude extract* etil asetat daun Bandotan

Pe ak	Perkiraan struktur	Nam a Seny awa	Pers en seny awa (%)	SI (%)
1		<i>2H-1-Benzopyran-2-one</i>	11,80	98
2		<i>Neophytadiene</i>	16,05	99



Gambar 4. Kromatogram GC dari fraksi 6 *crude extract* etil asetat daun Bandotan

Senyawa pada puncak ke-1 yaitu *2H1-benzopyran-2-one* yang merupakan golongan senyawa kumarin dan termasuk

senyawa fenolik. Kumarin adalah senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakton lingkaran enam dan bagian inutinya adalah *2H-benzopyran-2-one*. Senyawa tersebut termasuk kelompok senyawa *1-benzopyran* yang ditemukan pada tanaman Sarker, dkk., 2007. Senyawa *2H-benzopyran-2-one* yaitu komponen utama pada ekstrak *Artemisia annua* L. yang memiliki aktivitas antikanker (Isnawati, dkk., 2008).

Senyawa pada puncak ke-2, yaitu *neophytadiene* yang merupakan senyawa golongan diterpen. Diterpen termasuk kelompok senyawa terpenoid. Senyawa golongan diterpen tersusun dari 20 atom karbon yang diturunkan dari 2E, 6E, 10E -geranilgeranilpirofosfat (GGPP) (Sarker, dkk., 2007). Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa senyawa *neophytadiene* juga ditemukan dalam ekstrak etil asetat daun *Monoica Roxb*, senyawa bioaktif hasil analisa dengan GC-MS, senyawa ini memiliki aktivitas antikanker Sivakumar dan Dhiyya, 2015. Senyawa *neophytadiene* juga terbukti memiliki aktivitas antikanker terhadap terhadap ekstrak *Tiliacora acuminata* (Madhuyanthi, dkk., 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi 6 etil asetat daun *Ageratum conyzoides* Linn. Memiliki potensi yang lemah sebagai agen antikanker terhadap *cell line* kanker kolon WiDr dengan nilai IC_{50} 251,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
2. Uji fitokimia yang diperoleh positif mengandung golongan alkaloid dan terpenoid.
3. Hasil identifikasi GC-MS menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terdapat pada fraksi 6 etil asetat daun *Ageratum conyzoides*

Linn. yang diduga menunjukkan aktivitas antikanker yaitu senyawa *2H-benzopyran* dan *neophytadiene*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cannell, Richard, J.P. 1998. *Natural Product Isolations*. New Jersey: Humana Press.
- Cassidy, Jim. P., Johnston, E., Van Custem. 2006. *Colorectal Cancer*, New York: Informa Healthcare USA. Inc.
- Delimartha, S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid II*. Pustaka Pembangunan Swadaya Nusantara.
- Feri, Ari. B. S., Johni, A., Lenny, Anwar., 2003. Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan *Bauhinia hullettii* Prain Dan Uji In Vitro Sel Murine Leukemia P388. Skripsi. Program Studi Pendidikan Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Riau.
- Foye, W. O. 1996. *Prinsip-prinsip Kimia Medisinal. Jilid II Edisi Kedua*, Yogyakarta, UGM Press.
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, New York: John Willey & sonc. Inc Publication.
- Harvey, Alan. L. 2008. Natural Product in Drug Discovery. *Elsavier*.
- Haryanto, Sri. Nugroho,S. 2009. *Tumor - Kanker - Cara Pengobatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Isnawati, Ani., Mudahar, Harfia., Kamilatunisah. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kumarin dari Tanaman *Artemisia Annu* (L). Artikel. Media Litbang Kesehatan Volume XVIII. 3: 107-118. Jakarta: 1-6.
- Madhuvanthi,C., Santhosh Kumar,K., Antony Ceasar, S., Valivittan, K., Srinivasan,K., Tamilselvi, A. 2014. Antibacterial, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Solvent Extracts of *Tiliacora Acuminata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6 (9): 398403.
- Meiyanto, E., Susilowati, S., Murwanti, R., Sugiyanto, 2008. Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Pada Karsinogenesis Kanker Payudara Tikus. *Majalah Farmasi Indonesia*. 18 (3): 154-161.
- Mursyidi, A. 1985. *Statistika Farmasi dan Biologi*. Ghalia Indonesia: Jakarta.
- Pamilih, Heru. 2009. Uji Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*, UMS: Surakarta.
- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S., Kritz, Randall G., Engel. 2009. *Introduction to Spectroscopy (4th Ed.)*. Thomson Brooks/Cole: 797– 817.
- Peng, S. and Zhao, R. 2009. *Pharmaceutical Bioassays*. Published by John Wiley & Sons, Inc : Hoboken, New Jersey.
- Rahmawati, N., Katno., Triyono, A. 2008. Efek Sitotoksik Ekstrak Etanolik Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides* Linn.) Terhadap Sel HeLa. *Jurnal Balai Besar Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Tawangmangu, Jawa Tengah. 1: 47-51.
- Sarker, Satyajit D., and Nahar,Lutfun. 2007. *Chemistry for Pharmacy*.

- Sivakumar, R., and Dhivya, A. 2015. GC-MS Analysis Of Bioactive Compounds on Ethyl Acetate Extract of *Cordia Monoica* Roxb. Leaves. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*. 4 (1): 1328-1333.
Strathclyde Institute of Pharmacy & Biomedical Sciences, University of Strathclyde. 13. Student General organic and Natural product Chemistry. John Wiley & Sons Ltd.: Chicester, West Sussex.
- Sukadana, I M. 2010. Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Awar-awar (*Ficus septia* Burm F), *Jurnal Kimia*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran 4 (1): 63-70.