

**AKTIVITAS ANTIPROLIFERASI ISOLAT 4 EKSTRAK PETROLEUM ETHER
DAUN *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. PADA SEL KANKER
SERVIKS MANUSIA (HeLa)**

Dwi Utami

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
email: utamipurwantoro@yahoo.com

ABSTRAK

Kanker serviks merupakan penyebab kematian kedua wanita di Indonesia setelah kanker payudara. Mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl telah dikenal oleh masyarakat dan digunakan secara tradisional untuk pengobatan kanker. Ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel kanker serviks manusia (HeLa) dengan IC_{50} 9 $\mu\text{g/ml}$ (Kintoko dan Hawariah, 2007). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antiproliferasi isolat 4 ekstrak petroleum eter terhadap sel kanker serviks manusia (HeLa).

Serbuk daun mahkota dewa disokletasi dengan petroleum eter, kemudian difraksi dengan etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dilakukan kromatografi preparatif dengan fase gerak heksana : etil asetat (9:1). Aktivitas antiproliferasi terhadap sel HeLa ditetapkan harga LC_{50} dan *doubling time* melalui uji sitotoksik dan pengamatan kinetika proliferasi dengan metode MTT.

Hasil isolasi dengan kromatografi preparatif diperoleh lima isolat masing-masing dengan harga R_f : 0,05 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,60 ; dan 0,90. Harga LC_{50} dari isolat 4 adalah sebesar 82,091 $\mu\text{g/ml}$. Isolat 4 menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel HeLa dengan memperpanjang *doubling time* (16,495 jam) dibanding kontrol sel (10,170 jam).

Kata kunci: **Isolat 4, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, antiproliferasi, sel HeLa, petroleum eter.**

**ANTIPROLIFERATIV ACTIVITY OF ISOLATE 4 OF PETROLEUM ETHER
EXTRACT OF *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. LEAVES TO HUMAN
CERVICAL CANCER CELL LINES (Hela)**

ABSTRACT

Cervical cancer is a malignant tumor in cervix which is occupy the second position that cause the death of Indonesia's women under the breast cancer. One of the traditional medicine that can be used to cure cancer is *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl leaves. The petroleum eter extract of mahkota dewa leaves has antiproliferation activity againts cervical cancer cell lines (HeLa) with IC_{50} 9 $\mu\text{g/ml}$ (Kintoko and Hawariah, 2007). This research was aimed to detect antiproliferative activity of isolate 4 of ethyl acetate fraction of petroleum ether extract *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl leaves againts HeLa cell lines.

Initially, the powder of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl was extracted using Soxhlet apparatus with petroleum ether. The extracts was concentrated and partitioned until ethyl acetate fraction was obtained. The fraction of ethyl acetate was isolated using

Preparative Thin Layer Chromatography on silica gel F₂₅₄ as stationary phase and n-hexane : ethyl acetate (9 : 1) as mobile phase. Antiproliferation activity against HeLa cell lines was determined by LC₅₀ value by direct counting and *doubling time* value by MTT method.

The isolation by preparative thin layer chromatography resulted five isolate on Rf value: 0.05 ; 0.10 ; 0.20 ; 0.60 ; and 0.90. The LC₅₀ values of isolate 4 was 82.091 µg/ml. Isolate 4 showed cell cycle delay at concentration 45 µg/ml by lengthening the doubling time (16.495 hour) than cell control (10.170 hour).

Key words : Isolate 4, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, antiproliferation, HeLa cell, petroleum ether

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang dicirikan dengan keadaan sel yang tumbuh secara terus menerus tanpa kontrol dan mempunyai kemampuan untuk menyebar (bermetastasis) ke jaringan lain secara patologi (Hawariah, 1998). Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan merupakan penyakit pembunuh terbesar kedua setelah kardiovaskuler. Menurut laporan WHO tahun 2002, terdapat lebih dari 10 juta kasus kanker per tahun di dunia (Surh, 2003). Sedangkan di Indonesia penyakit kanker menjadi penyebab kematian keenam (Siswono, 2005). Dari tahun ke tahun penderita penyakit kanker jumlahnya terus meningkat termasuk di Indonesia dimana peningkatannya mencapai 190 ribu penderita kanker baru per tahun (Mariono dkk., 2002).

Di antara jenis kanker pada wanita, kanker leher rahim (serviks) merupakan jenis kanker maligna yang paling sering menyerang wanita, khususnya di negara-negara berkembang (Cronje, 2004) dengan jumlah penderita sebanyak 40 orang setiap 100.000 orang. Sedangkan di Indonesia diperkirakan jumlah pengidap kanker serviks antara 25-40 orang penderita setiap 100.000 orang per tahun (A. de Boer dkk, 2004).

Terapi konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker serviks

antara lain dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku, 2002). Namun terapi pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sedangkan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping meskipun kemoterapi mampu mengeluarkan keseluruhan sel-sel tumor (Hawariah, 1998).

Kegagalan dalam kemoterapi ini biasanya berkaitan dengan kegagalan agen antikanker tersebut untuk menginduksi kematian sel kanker secara terprogram (apoptosis) (Fisher, 1994). Karena itu, usaha pencarian agen kemoterapi baru yang mampu menginduksi kematian sel kanker secara apoptosis dengan memberikan efek samping minimum adalah sangat diperlukan dalam terapi kanker serviks, yaitu dengan mengembangkan senyawa dari bahan alami sebagai agen kemoterapi.

Mahkota dewa telah dikenal oleh masyarakat dan digunakan secara tradisional untuk pengobatan kanker. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel kanker serviks manusia (HeLa) dengan IC₅₀ 9 µg/ml (Kintoko dan Hawariah, 2007). Fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa

dengan nilai IC_{50} 25,409 $\mu\text{g/mL}$ (Sahara, 2010). Fraksi kloroform ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 71,83 $\mu\text{g/mL}$ (Kurniawati, 2010). Fraksi n-heksan ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 209,196 $\mu\text{g/mL}$ (Maulida, 2010). Fraksi metanol-air ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 431,635 $\mu\text{g/mL}$ (Pratama, 2010).

Target utama terapi kanker secara umum adalah dengan menghambat pertumbuhan sel kanker tersebut melalui induksi proses kematian sel secara apoptosis. Karena itu, diperlukan penelitian lanjut untuk mengisolasi komponen aktif dalam ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa dan menguji aktivitas antiproliferasi pada sel kanker serviks manusia (HeLa).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, gelas ukur, gelas beker, alat sokhlet, kertas saring, *vaccum rota evaporator*, penangas air, cawan porselin, pengaduk, plastik, karet pengikat, dan almari es, corong pisah, corong *buchner*, flakon dan kertas saring, autoclave, incubator CO_2 , lampu UV, *laminar air flow cabinet*, *tissue culture flask*, tabung conical, *microplate* 96 sumuran, haemocytometer, *microplate* 24 sumuran (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), neraca elektrik (Sartorius), mikropipet (Gilson), *cover slip*, *cover glass*, mikroskop fluoresense, *cell counter*, *ELISA reader*, *magnetic stirrer*, mikroskop, pipet,

neraca analitik, kamera digital, dan lemari es.

Bahan utama penelitian ini adalah serbuk kering daun mahkota dewa. Sedangkan bahan kimia yang diperlukan seperti pelarut untuk ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi adalah petroleum eter, etil asetat derajat teknis dan *pro analysis*, aquadest dan silika gel F_{254} yang diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi Fitokimia UAD. Sel HeLa, sel Vero, media DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle medium*), DMSO, PBS (*Phospat Buffered Saline*), Penisillin–Streptomisin 2%, Fungison 0,5%, FBS (*Fetal bovine serum*) 10%, Trypsin-EDTA 0,25% dalam PBS, SDS (*Sodium dodecyl sulfat*) 10% dalam HCl 0,01 N, NaHCO_3 teknis dan HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazin-N-2ethane sulfonic acid) teknis, dan *tripan blue*.

Prosedur Penelitian

1. Identifikasi Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl)

Tanaman Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) yang akan digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan identifikasi untuk memastikan kebenarannya. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengumpulan bahan

Pengambilan bahan uji daun mahkota dewa dilakukan pada bulan Maret tahun 2010 di Wates, Yogyakarta. Dalam penelitian ini digunakan daun yang masih segar dan tidak rusak. Persiapan sebelum bahan digunakan adalah daun dibersihkan dengan menggunakan air bersih yang mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang ada. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai daun mahkota

dewa benar-benar kering. Setelah daun mahkota dewa kering maka dilakukan penyerbukan.

3. Pembuatan ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl)

Serbuk daun mahkota dewa seberat 500 gram disari dengan alat Soxhlet menggunakan pelarut petroleum eter. Pelarut yang digunakan adalah 2x sirkulasi dengan kecepatan sirkulasi 6-8 sirkulasi/jam. Pembuatan ekstrak kental dengan Soxhlet ini dilakukan sampai zat aktif yang terdapat dalam daun mahkota dewa habis. Apabila zat aktif habis ditandai dengan jernihnya pelarut yang digunakan. Apabila filtrat telah didapatkan maka filtrat dimasukkan ke dalam *vaccum rota evaporator* kemudian diuapkan pelarutnya sampai pelarutnya tidak menetes lagi. Penggunaan *vaccum rota evaporator* pada suhu 60-70 °C dan 1,5 putaran. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

4. Pembuatan fraksi etil asetat daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl)

Ekstrak kental yang diperoleh dilarutkan dalam etil asetat kemudian dilakukan fraksinasi dengan air, kemudian digojog di dalam corong pisah lalu didiamkan selama 24 jam agar fraksi etil asetat dan fraksi air terpisah sempurna. Setelah didiamkan selama 24 jam fraksi air beserta endapan-endapan yang ada didalamnya dikeluarkan. Hasil fraksi etil asetat disaring menggunakan corong *buchner* agar penyaringan lebih sempurna dan endapan yang ada didalamnya benar-benar terpisahkan. Fraksi etil asetat yang didapat disimpan di lemari es.

5. Pembuatan isolat dari fraksi etil asetat daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl)

Fraksi etil asetat yang diperoleh sebanyak 448,5 ml, dipekatkan di lemari asam hingga, kemudian diambil dengan pipa kapiler secukupnya dan dibuat pita diatas plate KLT hingga semua fraksi habis. Kemudian ditunggu beberapa saat sampai pita kering. Setelah itu dimasukkan ke chamber yang sudah diberi fase gerak berupa heksan : etil asetat (9:1). Elusi sampai batas yang telah ditentukan. Apabila elusi telah selesai dilakukan, maka segera dikeringkan kaca di suhu kamar. Silica gel 60 GF₂₅₄ dikerok sesuai isolat yang diinginkan. Isolat tersebut digunakan untuk uji sitotoksik terhadap sel HeLa. Isolat dimurnikan kembali dengan kromatografi Vakum Cair dengan fase gerak kloroform : methanol (1:1)

6. Uji Aktivitas Sitotoksik

Sebelum dilakukan uji sitotoksitas, terlebih dahulu dibuat larutan stok sampel dengan cara mencampur isolat fraksi etil asetat daun mahkota dewa dengan media DMEM. Larutan stok dibuat dengan cara menimbang isolat fraksi etil asetat daun mahkota dewa kemudian ditambah DMSO atau tween sebanyak 30 µl dan ditambahkan dengan media DMEM hingga 1000 µl, sehingga konsentrasi tertentu, dari konsentrasi larutan tersebut kemudian dibuat seri kadar dan larutan dalam berbagai kadar tersebut dapat diujikan pada sel HeLa. Pembuatan larutan uji ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* secara aseptis.

Sel dengan kepadatan 1×10^4 sel/100µl didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi bersama isolat fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa dengan 6 kadar berbeda 750; 375; 187,5 ; 93,75; 46,88 dan 23,49 µg/ml. Selanjutnya *microplate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu media dalam sumuran di

sedot habis kemudian ditambahkan tripsin-EDTA sebanyak 100 μ l dan dilakukan resuspensi berlahan-lahan. Setelah didiamkan 3 menit dilakukan penambahan larutan *tripan blue* sebanyak 100 μ l. Penghitungan jumlah sel hidup dilakukan langsung pada *haemocytometer*.

Sebelum penggunaan *haemocytometer* sebagai media penghitung sel, harus dilakukan pembersihan *haemocytometer* dan objek glass menggunakan alkohol 70%. Setelah itu ambil 10 μ l larutan suspensi yang telah ditambahkan *tripan blue* menggunakan pipet pasteur dan dimasukkan kedalam *chamber haemocytometer*. Sel yang berwarna biru menandakan sel tersebut mati, sedangkan sel yang berwarna bening menandakan sel tersebut masih hidup (Doyle and Griffiths, 2000).

7. Uji kinetika proliferasi dengan metode MTT

Sel distarvasi (dipuaskan) selama 24 jam dalam media kultur yang mengandung FBS 0,5%. Selanjutnya sel ditumbuhkan di dalam *plate* 96 sumuran (*multiple dishes*) dengan medium ditambah sampel dengan konsentrasi yang tidak mematikan (dibawah nilai IC_{50}), sampling dilakukan pada jam 24, 48 dan 72. Masing-masing sumuran dihitung jumlah sel yang hidup dengan metode MTT dan dibuat kurva absorbansi vs waktu inkubasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi, identifikasi makroskopis dan mikroskopis menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl).

Serbuk daun mahkota dewa disokletasi dengan petroleum untuk

memperoleh ekstrak petroleum eter, selanjutnya ekstrak petroleum eter dilakukan fraksinasi cair-cair menghasilkan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat yang telah diperoleh kemudian dilakukan isolasi dengan menggunakan KLT-preparatif dengan fase diam silica gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksana : etil asetat (9 : 1) berdasarkan hasil orientasi fase gerak yang menghasilkan spot paling banyak.

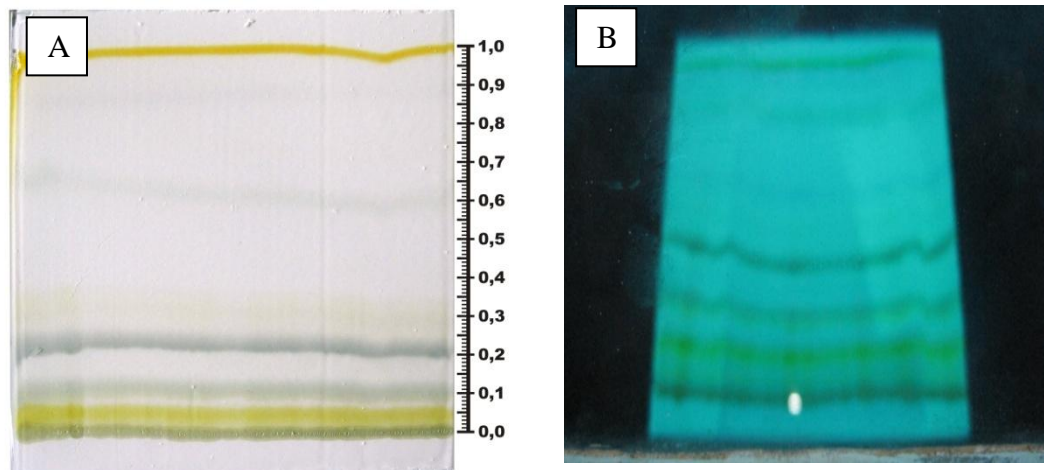
Tahap purifikasi untuk menghasilkan isolat dilakukan dengan KLT preparatif, dengan cara menotolkan bentuk pita dari fraksi etil asetat pada lempeng 20 x 20 cm yang telah dilapisi silica gel GF₂₅₄ dan dielusi dalam bejana kromatografi dengan fase gerak heksana : etil asetat (9 : 1). Hasil KLT preparatif menunjukkan adanya 5 pita seperti terlihat pada Gambar 1. Pita 1 dengan harga Rf : 0,05 selanjutnya disebut sebagai isolat 1, pita 2 dengan harga Rf : 0,10 (isolat 2), pita 3 dengan harga Rf : 0,20 (isolat 3), pita 4 dengan harga Rf : 0,60 (isolat 4) dan terakhir pita 5 dengan harga Rf : 0,90 disebut sebagai isolat 5.

Isolat 4 yang diperoleh sebanyak 25,3 mg. Tahapan selanjutnya dari penelitian ini adalah uji aktivitas antiproliferatif dari isolat 4. Seri kadar isolat uji terhadap sel HeLa adalah 750; 375; 187,5; 93,75; 46,88 dan 23,49 μ g/ml. Berdasarkan Tabel 3 dan grafik hubungan konsentrasi dengan % kematian sel (Gambar 2) terlihat bahwa isolat 4 menunjukkan bersifat toksik terhadap sel HeLa yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi. Parameter yang digunakan untuk mengevaluasi potensi ketoksikan senyawa uji terhadap sel HeLa adalah LC_{50} . Perhitungan LC_{50} menggunakan analisis probit berdasarkan pada grafik fungsi linear log konsentrasi vs nilai probit dari % kematian akibat pemberian zat uji. Harga LC_{50} diperoleh dengan memasukkan probit-5 ke dalam

persamaan garis lurus tersebut. Berdasarkan harga LC_{50} , terlihat bahwa isolat 4 memiliki aktivitas sitotoksik tertinggi terhadap sel HeLa dengan harga LC_{50} 82,091 $\mu\text{g/mL}$.

Aktivitas antiproliferasi isolat diuji dengan pengamatan kinetika proliferasi pada waktu 24,48 dan 72 jam dengan metode MTT guna melihat jumlah sel yang setara dengan absorbansi. Gambar 3 menunjukkan pada kontrol sel absorbansi (jumlah sel hidup) mengalami kenaikan. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin meningkat pula jumlah sel yang hidup.

Pada perlakuan sediaan uji terjadi kenaikan jumlah sel yang sangat pesat pada jam ke-24, diduga sel mengalami *lag time* atau fase adaptasi. Pada jam ke-48 perlakuan sediaan uji mengalami peningkatan tetapi pada jam ke-72 kembali menurun. Hal ini dapat disebabkan karena sel mengalami kematian. Kematian ini dapat melalui mekanisme *arrest* (siklus sel berhenti) dulu baru mengalami apoptosis atau langsung mengalami apoptosis. Dengan terhentinya siklus sel maka sel tidak dapat menggandakan dirinya.



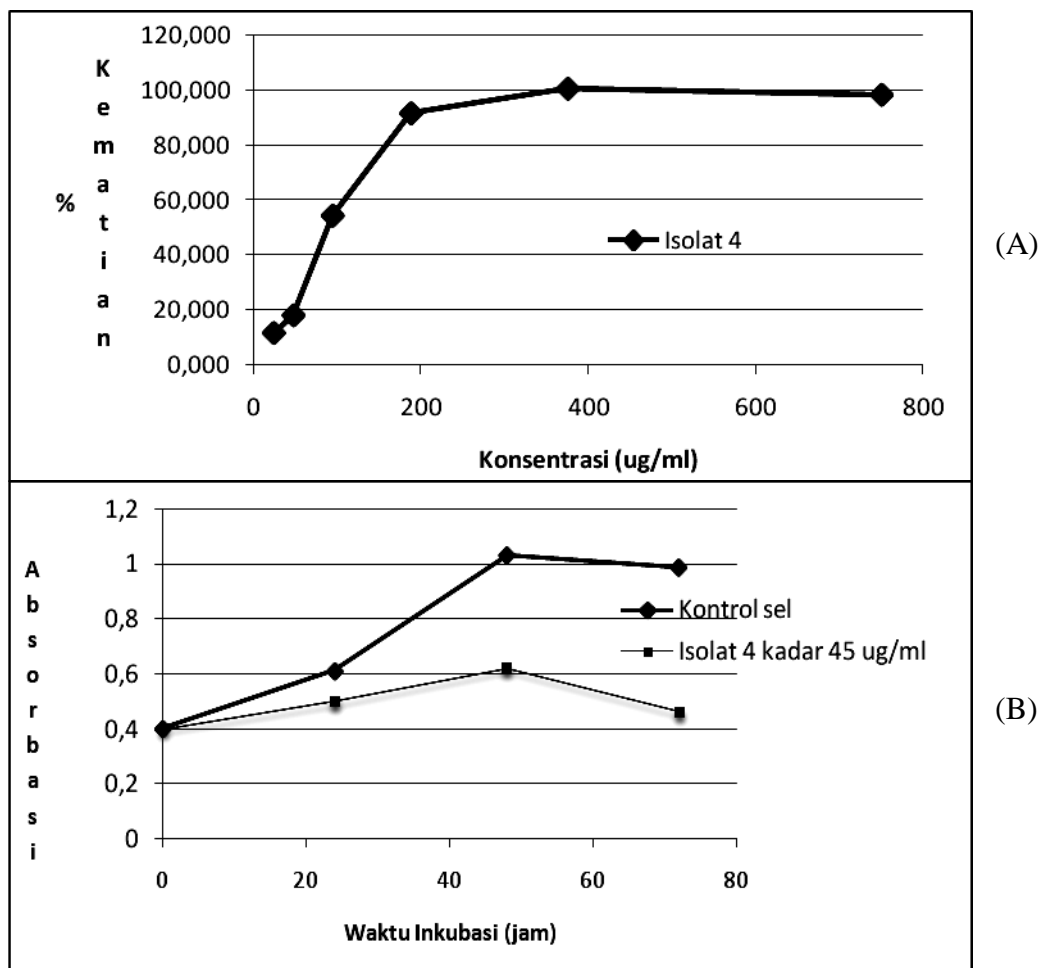
Gambar 1. Profil KLT preparatif fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
 Fase diam : Silika gel GF₂₅₄, Fase gerak heksana-etil asetat (9:1)
 A. Sinar tampak
 B. Dibawah sinar UV 254 nm

Tabel 1. Hasil KLT preparatif Fraksi Etil Asetat

Nama Bercak	Harga Rf	Detektor	
		Visual	254 nm
Isolat 1	0,05	Kuning	Tidak Fluoresensi biru
Isolat 2	0,10	Biru muda	Fluoresensi biru lemah
Isolat 3	0,20	Biru muda	Fluoresensi biru lemah
Isolat 4	0,60	Biru	Fluoresensi biru
Isolat 5	0,90	Biru tua	Fluoresensi biru

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi isolat 4 pada kematian sel (%) sel HeLa.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% kematian sel
750	$98,476 \pm 0,09$
375	$100,653 \pm 1,11$
187,5	$91,726 \pm 2,42$
93,75	$54,491 \pm 3,18$
46,88	$18,236 \pm 3,28$
23,49	$11,813 \pm 8,02$



Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi isolat 4 ($\mu\text{g/ml}$) terhadap prosentase kematian sel HeLa (A) dan kinetika proliferasi sel HeLa dibandingkan terhadap kontrol (B)

Tabel 4. Persamaan grafik log jumlah sel hidup vs waktu pada kinetika proliferasi sel HeLa dengan berbagai perlakuan

Perlakuan	Persamaan garis	Slope	Linearitas	Doubling time (jam)
Kontrol	$Y = 0,02430 x + 3,8041$	0,02430	0,9875	10,170
Isolat 4	$Y = 0,0159 x + 3,7892$	0,0159	0,9848	16,495

Sifat antiproliferasi ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol sel. Pada penelitian ini nilai *doubling time* kontrol sel lebih kecil dibanding perlakuan. Pada kontrol sel diperoleh *doubling time* 10,170 jam dan *doubling time* sediaan uji isolat 4 dengan harga 16,495 jam. Hal ini menandakan bahwa isolat 4 memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel HeLa melalui penghambatan *doubling time*.

Mekanisme penghambatan proliferasi kemungkinan melalui protein-protein pengatur proliferasi dan apoptosis seperti up-regulasi protein pro apoptosis Bax dan menginduksi aktivitas caspase-caspase sebagai mesin penggerak program apoptosis (Faried dkk), selain itu juga menurunkan regulasi protein anti apoptosis Bcl-2 dan Xiap. Atau pun melalui pembentukan fragmentasi DNA, penurunan ekspresi Bcl mRNA dan kenaikan ekspresi Bax mRNA (Tjandrawinata dkk, 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Isolasi fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif fase gerak heksana : etil asetat (9: 1) menghasilkan 5 isolat yang belum terpurifikasi.
2. Aktivitas sitotoksik isolat 4 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) adalah sebesar 82,091 µg/ml (LC₅₀)
3. Isolat 4 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) mampu menghambat proliferasi sel HeLa

dengan memperpanjang *doubling time* pada kadar 45 µg/ml.

B. Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap isolat hasil KLT preparatif, dengan kromatografi kolom ataupun HPLC.
2. Perlu dilakukan purifikasi lebih lanjut terhadap isolat 4 yang memiliki aktivitas antiproliferasi tertinggi terhadap pertumbuhan sel HeLa.
3. Perlu dikaji lebih lanjut mekanisme penghambatan pertumbuhan sel HeLa secara molekuler melalui uji imunositokimia terhadap enzim, protein ataupun gen yang berperan dalam proliferasi ataupun apoptosis.

DAFTAR PUSTAKA

- A.de Boer, M., A.W. Peter, L., Aziz, M.F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M.A., S. Jordanova, E., Uljee, S.K. and Fleuren, G.J., 2004, Human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 variant in cervical cancer in Indonesia, Suriname, Netherland, *Gyn. Oncol.* Vol.94, 488-494.
- Apantaku, L.M., 2002, Breast-conseving surgery for breast cancer, *Am.Fam.Physician*, Vol.66, No.12, 2271-2278.
- Hawariah, L.P., 1998, *Kanker Payudara*, Penerbit universiti Putra Malaysia, Serdang.
- Cronje, H.S. 2004. Screening of cervical cancer in developing countries. *Int. J. Gyn and Obst*, Vol.84, 101-108.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2006, Anticancer Effects of Gallic Acid

- Isolated from Indonesian Herbal Medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on Human Cancer Cell Lines : *International Journal of Oncology*, Padjadjaran University Faculty of Medicine, Bandung.
- Fisher, D.E., 1994, Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold, *Cell*, Vol.78, No.4, 539-542.
- Kurniawati, Anisa, 2010, Sitotoksitas Fraksi Kloroform Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel HeLa dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Kintoko dan Hawariah, 2007, Antiproliferative effect of extract of mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] on selected cancer cell line and its mode of cell death, *Proceeding of the 1st International Conference on Chemical Science*, 229-231.
- Mariono, S.A., Jusuf, A., Kresno, S.B., 2002, Karakteristik kandungan DNA dan aktivitas proliferasi pada kanker paru di Jakarta, *Cermin Dunia Kedokteran*, Vol.127, 15-17.
- Maulida, Nisa, A., 2010, Sitotoksitas Fraksi n-Heksan Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel HeLa dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Pratama, Anton, 2010, Sitotoksitas Fraksi Metanol-Air Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel HeLa dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Sahara, Nasa Milta, 2010, Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel HeLa dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Siswono, 2005, Setiap tahun 190 ribu penderita kanker baru, <http://www.gizi.net> diakses 12 November 2006.
- Surh, Y.J., 2003, Cancer Chemoprevention with Dietary Phytochemicals, *Nature Reviews Cancer*, Vol 3, 768 – 780.
- Tjandrawinata RR, Arifin PF, Tandrasasmita OM, Rahmi D, Aripin A, 2010, DLBS1425, a *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. extract confers anti proliferative and proapoptosis effects via eicosanoid pathway, *J. Ther. Oncol*, Vol.3, 187-201.