



**SKRINING AWAL EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH (*Piper betle* Linn)
SEBAGAI ANTIKANKER DENGAN METODE BRINE SHRIMP
LETHALITY TEST (BLT)**

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan
melengkapi syarat dalam menempuh
Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran

Oleh:

**Arya Srisadono
G2A 004 029**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

HALAMAN PERSETUJUAN

Telah disetujui oleh dosen pembimbing Artikel Penelitian Karya Tulis Ilmiah

atas nama :

Nama : Arya Srisadono
NIM : G2A004029
Fakultas : Kedokteran
Universitas : Diponegoro
Ruang Lingkup Keilmuan : Farmasi
Judul : Skrining awal ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle*
Linn) sebagai antikanker dengan metode *Brine*
Shrimp Lethality Test (BLT)
Pembimbing : Dr. Henna Rya Sunoko, Apt, MES

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan dalam menempuh program pendidikan sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Semarang, 28 Agustus 2008

Pembimbing

Dr. Henna Rya Sunoko, Apt, MES

NIP: 320 002 500

HALAMAN PENGESAHAN
ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**SKRINING AWAL EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH (*Piper betle* Linn)
SEBAGAI ANTIKANKER DENGAN METODE BRINE SHRIMP
LETHALITY TEST (BLT)**

Telah diuji dan dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tanggal 25 Agustus 2008 dan telah diperbaiki sesuai saran-saran yang diberikan.

Semarang, 28 Agustus 2008

Ketua Penguji

Penguji

dr. Andrew Johan, MSi
NIP:131 673 427

dr. Banundari Rachmawati, Sp. PK (K)
NIP: 131 803 412

Pembimbing

Dr. Henna Rya Sunoko, Apt, MES
NIP: 320 002 500

The Early Screening of Ethanol Extract of Sirih Leaf (Piper betle Linn) as Anticancer Using Brine Shrimp Lethality Test (BLT) Method.

Arya Srisadono¹, Henna Rya Sunoko²

ABSTRACT

Background: Cytotoxic agents are distributed in various plants. Sirih (*Piper betle* Linn) has a potential cytotoxic activity because it contains flavonoid known as anticancer compound. Early screening of sirih leaf using Brine Shrimp Lethality Test (BLT) method is needed to know its cytotoxic activity. The aim of this research is to prove the present of anticancer activity in sirih leaf using BLT method.

Method: This research was an experimental research using post test only control group design. Amount of *Artemia salina* Leach larvae used were 10 larvae in every group. In this research, there were 5 groups done 3 times replication for each group. The first until the fourth groups were given doses consecutively 10.000 µg/ml, 1000 µg/ml, 100 µg/ml, and 10 µg/ml ethanol extracts of sirih leaf, whereas the fifth group was a control (0 µg/ml). Data were gotten from calculating amount of died larvae at 24 hours after treatment then the data were calculated for LC 50 value of ethanol extract of sirih leaf using probit analysis consisted in SPSS 11.5 for windows.

Result: The result of probit analysis indicated that LC 50 value of ethanol extract of sirih leaf was 296,546 µg/ml with upper limit at 563,638 µg/ml and lower limit at 158,762 µg/ml.

Conclusion: The administering of ethanol extract of sirih leaf had a cytotoxic activity to *Artemia salina* Leach larvae indicated by LC 50 value <1000 µg/ml. Therefore, evidently based on BLT method, the ethanol extract of sirih leaf had an anticancer activity.

Key words: *Piper betle* Linn, brine shrimp lethality test, cytotoxicity.

¹ Undergraduate student, Medical Faculty of Diponegoro University, Semarang

² Lecturer, Department of Pharmacy, Medical Faculty of Diponegoro University, Semarang

Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn) sebagai Antikanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT)

Arya Srisadono¹, Henna Rya Sunoko²

ABSTRAK

Latar belakang: Agen-agen sitotoksik banyak tersebar di berbagai tanaman. Sirih (*Piper betle* Linn) berpotensi memiliki aktivitas sitotoksik karena mengandung flavonoid yang dikenal sebagai senyawa antikanker. Skrining awal dari daun sirih dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT) perlu dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksiknya. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya aktivitas antikanker pada daun sirih menurut metode BLT.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang digunakan adalah 10 ekor larva tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan dan dilakukan replikasi 3 kali untuk tiap kelompok perlakuan. Kelompok pertama sampai keempat diberi dosis berturut-turut 10.000 µg/ml, 1000 µg/ml, 100 µg/ml, dan 10 µg/ml ekstrak etanol daun sirih, sedangkan kelompok kelima sebagai kontrol (0 µg/ml). Data diperoleh dari menghitung jumlah larva yang mati 24 jam setelah perlakuan kemudian dihitung harga LC 50 ekstrak etanol daun sirih dengan analisis probit menggunakan *SPSS 11.5 for windows*.

Hasil: Hasil analisis probit menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak etanol daun sirih adalah 296,546 µg/ml dengan batas atas 563,638 µg/ml dan batas bawah 158,762 µg/ml.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak etanol daun sirih bersifat sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 µg/ml, sehingga membuktikan adanya aktivitas antikanker dari ekstrak etanol daun sirih menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT).

Kata kunci: *Piper betle* Linn, *brine shrimp lethality test*, sitotoksisitas

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

² Staf Pengajar, Bagian Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Pengembangan tanaman obat untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan telah banyak dilakukan. Banyak penelitian dilakukan untuk menemukan obat-obat baru yang berguna untuk mengobati berbagai macam penyakit yang sekarang sulit diobati. Masyarakat di negara berkembang umumnya masih menggunakan pengobatan tradisional sebagai bagian integral dari budaya mereka. Menurut sejarah, banyak obat-obatan medik berasal dari tanaman, namun masih banyak dalam bentuk yang sederhana berasal dari bahan bakunya atau merupakan bahan aktif dari suatu ekstrak tanaman.¹

Di Indonesia banyak sekali tanaman yang dikenal berkhasiat obat.² Dari berbagai tanaman itu, perlu dilakukan uji khasiat terhadap bahan aktifnya. *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT) merupakan uji yang sangat berguna untuk mengetahui skrining awal bahan aktif dari suatu ekstrak tanaman. BLT adalah suatu *bioassay* untuk mendeteksi bioaktivitas dari suatu tanaman. *Bioassay* ini mudah dilakukan, murah, dan hanya memerlukan sedikit bahan uji.³⁻⁵ Metode ini merupakan skrining awal yang dapat disempurnakan oleh *bioassays* lainnya yang lebih spesifik dan lebih mahal setelah senyawa aktif dari suatu bahan uji dapat dipisahkan.⁶ Setelah diperkenalkan oleh Meyer dkk. tahun 1982,⁴ uji lethalitas ini telah berhasil dipakai sebagai *bioassay-guide* untuk fraksinasi agen-agen sitotoksik dan antitumor aktif seperti trilobacin dari kulit pohon *Asimina triloba*,⁷ *cis-annonacin* dari *Annona muricata*,⁸ dan *ent-kaur-16-en-19-oic acid* dari *Elaeoselinum foetidum*.⁹

Obat-obat antikanker sekarang banyak sekali jenisnya. Obat-obat antikanker yang paling ideal dapat memberantas sel-sel kanker tanpa merusak jaringan-jaringan normal. Namun, agen-agen yang ada sekarang ini belum memenuhi kriteria tersebut, dan penggunaan klinis obat-obat ini menyangkut pertimbangan manfaatnya terhadap toksisitas dalam upaya mencari indeks terapeutik yang menguntungkan.¹⁰ Penggunaan tanaman obat untuk terapi biologik kanker telah banyak diteliti dalam dekade terakhir ini. Diharapkan dari banyaknya penelitian terhadap tanaman obat akan ditemukan berbagai obat antikanker baru yang aman, efektif, dan efisien.

Agen-agen sitotoksik tersebar di berbagai tanaman.⁶ Oleh karena itu, tanaman-tanaman obat telah banyak diteliti potensi sitotoksiknya. Sirih (*Piper betle* Linn) berpotensi memiliki aktivitas sitotoksik karena mengandung senyawa flavonoid¹¹ yang dikenal memiliki aktivitas antikanker.¹²

Sirih merupakan tanaman yang telah dikenal oleh masyarakat dan banyak digunakan untuk tujuan pengobatan. Sirih banyak digunakan untuk pengobatan penyakit asma, rheumatik arthritis, rheumatalgia, dan luka-luka.² Penelitian daun sirih sebagai antikanker belum banyak dilakukan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara bermakna.¹³ Akan tetapi, belum ada penelitian tentang daun sirih sebagai agen tunggal senyawa antikanker. Oleh karena itu, perlu untuk dilakukan skrining awal kemampuan sitotoksik dari daun sirih sebelum diujicobakan pada sel kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya aktivitas antikanker pada daun sirih menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT) sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian lebih lanjut pada sel kanker.

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini antara lain: (1) sebagai skrining awal aktivitas antikanker dari daun sirih, (2) menunjukkan bahwa daun sirih merupakan tanaman obat yang potensial untuk dikembangkan dalam terapi kanker, dan (3) merupakan penelitian awal dalam upaya pengembangan penelitian daun sirih sebagai obat antikanker.

METODA PENELITIAN

Ekstraksi daun sirih dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Desain penelitian eksperimental ini adalah *Post test-Only Control Group Design*, dengan randomisasi acak sederhana. Sampel penelitian berjumlah 150 ekor larva *Artemia salina* Leach dengan kriteria inklusi berumur 48 jam dan tidak tampak cacat secara anatomi. Sebagai kriteria eksklusi yaitu: larva *Artemia salina* Leach yang tidak menunjukkan aktivitas pergerakan sebelum perlakuan.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol daun sirih. Dengan alasan dekat dari tempat peneliti maka daun sirih diambil dari desa Kuncen, Kecamatan Ungaran, Kabupaten Semarang selama bulan Desember 2007. Daun sirih dipilih, dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan diangin-anginkan pada suhu kamar agar senyawa

yang terkandung tidak rusak. Kemudian 180 gram daun sirih kering dimasukkan ke dalam 3 labu Erlenmeyer, masing-masing labu 60 gram. Kemudian direndam dengan etanol 96 % masing-masing 600 ml, maserasi selama 48 jam. Setelah itu, cairan dalam labu Erlenmeyer disaring menggunakan kain flannel dan diuapkan dengan diangin-anginkan sampai kering. Setelah kering, 500 mg ekstrak pekat dilarutkan dalam 10 ml air laut sehingga kadarnya 50.000 µg/ml (larutan A). Dari larutan A ini dibuat:

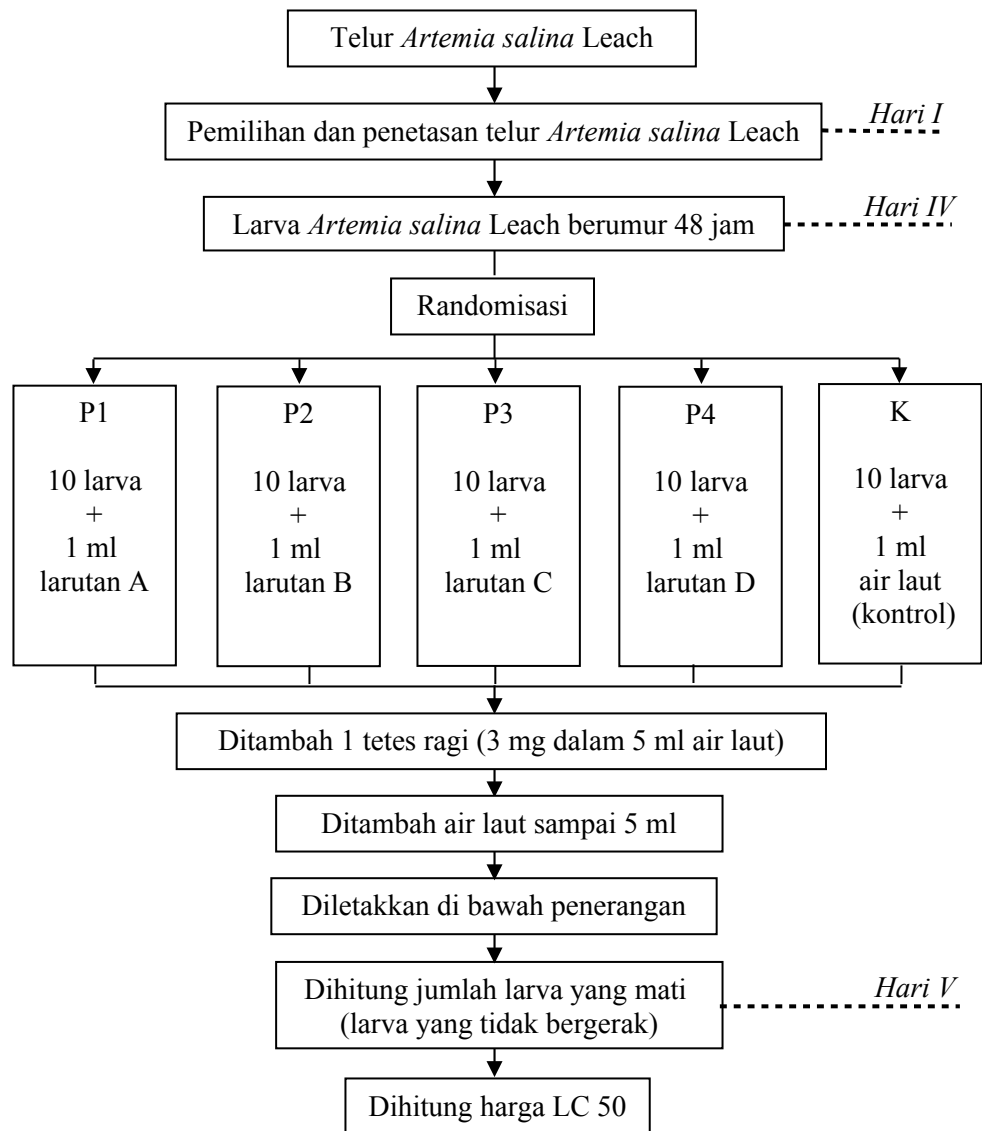
- Larutan B: 1 ml larutan A ditambah 9 ml air laut, sehingga kadarnya 5000 µg/ml.
- Larutan C: 1 ml larutan B ditambah 9 ml air laut, sehingga kadarnya 500 µg/ml.
- Larutan D: 1 ml larutan C ditambah 9 ml air laut, sehingga kadarnya 50 µg/ml.

Pada hari pertama penelitian, dilakukan pemilihan dan penetasan terhadap telur *Artemia salina* Leach. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam wadah berisi air laut secukupnya. Telur diletakkan di bagian yang gelap, sedangkan bagian lain diterangi dengan sinar lampu. Setelah 24 jam perendaman, telur menetas dan larva udang bergerak ke bagian yang terang. Kondisi ini dibiarkan sampai larva udang berumur 48 jam.

Larva udang yang telah berumur 48 jam dimasukkan ke dalam seri tabung uji (flakon) yang berisi ekstrak etanol daun sirih yang telah disiapkan (larutan A, B, C, D

dan kontrol) masing-masing sebanyak 10 ekor. Masing-masing tabung uji ditambahkan 1 tetes ragi (3 mg dalam 5 ml air laut) sebagai makanan udang. Volume tabung uji dicukupkan dengan air laut hingga 5 ml. Semua tabung uji diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati.

Data hasil penelitian adalah data primer yang didapatkan dari jumlah larva udang yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak etanol daun sirih. Setelah melewati proses *editing*, *coding*, *entry*, dan *cleaning*, data dianalisis dengan analisis probit menggunakan *SPSS 11.5 for windows* untuk mengetahui harga LC 50.



Gambar 1. Alur Penelitian. Penelitian dimulai dengan melakukan pemilihan dan penetasan terhadap telur *Artemia salina* Leach. Setelah larva berumur 48 jam dilakukan randomisasi dan dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak etanol daun sirih terhadap larva disesuaikan dengan kelompok perlakuannya. Setelah itu, ditambahkan 1 tetes ragi pada tiap tabung uji, ditambah air laut sampai 5 ml, dan diletakkan di bawah penerangan. Setelah 24 jam, dihitung jumlah larva yang mati dan dihitung harga LC 50 dari ekstrak etanol daun sirih.

HASIL PENELITIAN

Data dari tabel 1 menunjukkan bahwa derajat lethalitas berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak yang diberikan. Mortalitas maksimal terlihat pada konsentrasi 10.000 µg/ml sedangkan mortalitas minimal terlihat pada konsentrasi 10 µg/ml.

Tabel 1. Uji toksisitas ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

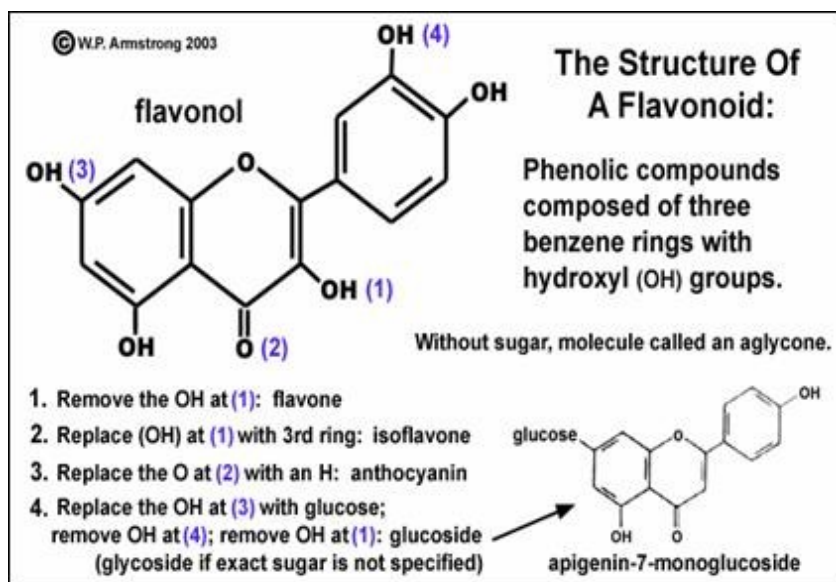
Konsentrasi (µg/ml)	Log konsentrasi	Kematian			Jumlah kematian	Jumlah larva	Rata-rata % kematian
10.000	4	10	10	10	30	30	100
1000	3	7	7	5	19	30	63
100	2	3	2	3	8	30	27
10	1	1	2	-	3	30	10
0	-	-	-	-	0	30	0

Hasil dari analisis probit menunjukkan bahwa harga LC 50 dari ekstrak etanol daun sirih adalah 296,546 µg/ml dengan batas atas 563,638 µg/ml dan batas bawah 158,762 µg/ml.

PEMBAHASAN

Brine Shrimp Lethality Test (BLT) merupakan suatu *bioassay* untuk mendeteksi bioaktivitas dari suatu ekstrak tanaman yang berhubungan dengan kemampuan sitotoksik dan antitumor.¹² Suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker menurut metoda BLT jika harga LC 50 <1000 µg/ml.⁴ Hasil pengujian

terhadap ekstrak etanol daun sirih didapatkan harga LC 50 sebesar 296,546 µg/ml, sehingga dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker menurut metode BLT. Adanya lethalitas yang signifikan dari ekstrak etanol daun sirih ini juga mengindikasikan adanya komponen senyawa sitotoksik potensial yang menjamin dilakukannya penelitian lebih lanjut.¹⁵



Gambar 2. Struktur kimia dari flavonoid. (Dikutip dari: www.solvo.hu)

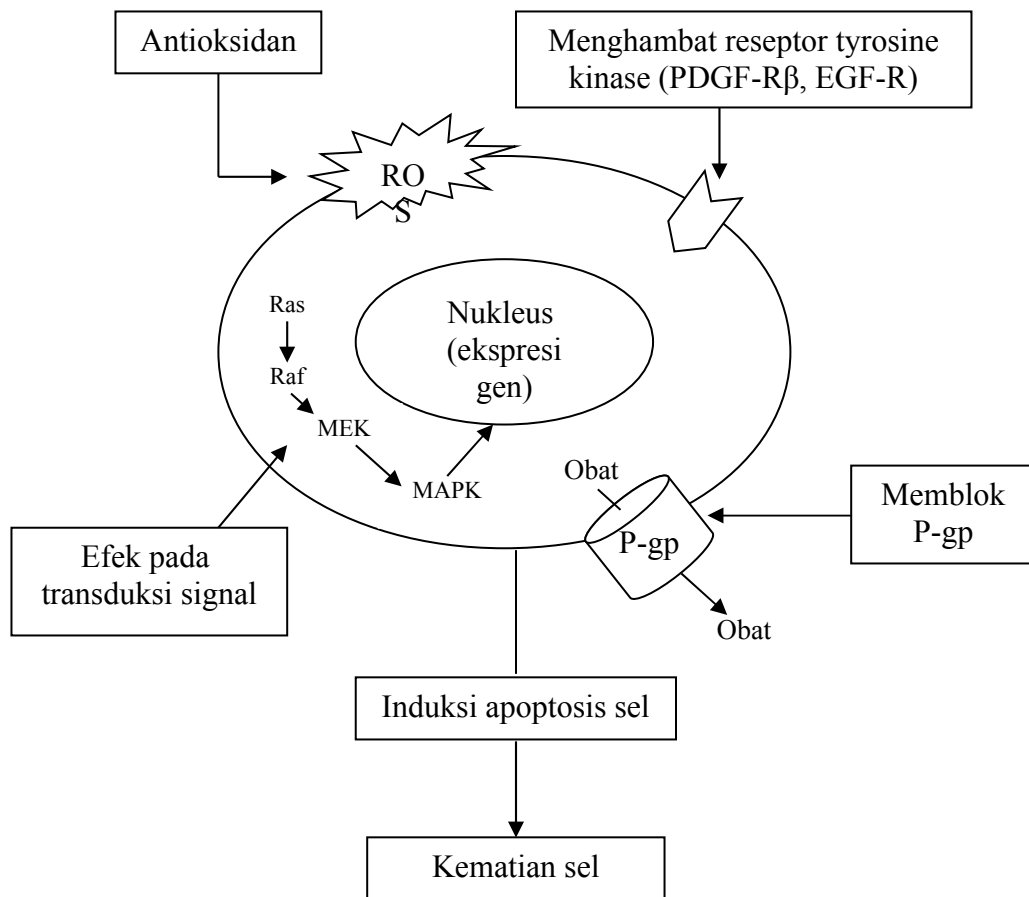
Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun sirih mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, dan steroid.¹¹ Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang dikenal memiliki aktivitas antikanker. Sedikitnya terdapat 5 mekanisme aktivitas antikanker dari polifenol:¹⁶⁻²¹ Pertama, kemampuan antioksidan dari polifenol dapat melindungi sel dari kerusakan DNA dengan membersihkan sel dari radikal bebas (*Reactive*

Oxygen Species / ROS).¹⁶ Kedua, polifenol memodulasi protein yang berperan dalam jalur transduksi signal seperti *activator protein 1* (AP-1), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI 3'-K), p70S6-K dan Akt.^{16,17} Ketiga, polifenol mengurangi aktivitas dari *tyrosine kinase receptors* (PDGF-R β , EGF-R) yang berperan dalam proliferasi ganas dari sel tumor.¹⁶ Keempat, polifenol menginduksi apoptosis pada sel tumor.¹⁶⁻²¹ Kelima, polifenol mengatasi resistensi multiobat dengan memblok efluks *P-glycoprotein* (P-gp) terhadap obat-obat antikanker.¹⁶ Dari kelima mekanisme tersebut yang berperan dalam mekanisme sitotoksik adalah dengan menginduksi program kematian sel (apoptosis).¹⁶⁻²¹

Menurut penelitian sebelumnya, mekanisme apoptosis dari senyawa polifenol tanaman adalah dengan mobilisasi tembaga (*copper*) intraselular dan ekstraselular.¹⁸ Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid, tannic acid, gallic acid, curcumin, dan resveratrol menyebabkan pemecahan rantai oksidatif di dalam DNA dengan adanya Cu (II). Pada reaksi ini, Cu (II) direduksi menjadi Cu (I), dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti *hydroxyl radical* (OH \cdot) terbentuk, yang berperan sebagai agen pemecah DNA.^{18,22}

Mekanisme lain dari flavonoid dalam menginduksi apoptosis sudah banyak diteliti. Sebagai contoh *Epigallocatechin gallate* (EGCG), salah satu flavonoid yang terdapat dalam teh, dapat berikatan dengan reseptor Fas (CD-95 atau APO-1) sehingga dapat menginduksi apoptosis melalui jalur ekstrinsik.¹⁶ Flavonoid yang lain, misalnya resveratrol, menginduksi p38 MAPK dan memediasi aktivasi p53 yang

berakibat terhambatnya siklus sel dan mengawali jalur apoptosis.^{17,19,20} Penelitian lain menyebutkan bahwa efek stimulasi apoptosis dari resveratrol juga diperlihatkan melalui sebuah jalur mitokondria baru yang dikontrol oleh Bcl-2.²¹ Mekanisme flavonoid sebagai antikanker yang terkandung dalam daun sirih belum diketahui, sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 3. Mekanisme flavonoid sebagai antikanker. (dikutip dari: Demeule M, Levesque JM, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J et al. Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr. Med. Chem. – Anti Cancer Agents* 2002;2:441-63)

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol daun sirih bersifat sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 µg/ml, sehingga membuktikan adanya aktivitas antikanker dari ekstrak etanol daun sirih menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BLT).

SARAN

Pada penelitian ini telah terbukti bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki aktivitas sitotoksik. Dengan dasar ini, diperlukan penelitian lebih lanjut pada sel kanker untuk membuktikan adanya aktivitas antikanker dari daun sirih.

Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih jauh untuk mengisolasi senyawa aktif yang bersifat antikanker dari tanaman ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Drs. Gunardi, MS, Apt dan staf bagian Farmasi dan Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Farnsworth NR, Soejarto DD. Global importance of medicinal plants. In: Akerele O, Heywood V, Synge H, editors. The conservation of medicinal plants. Cambridge: Cambridge University Press; 1991. p. 25-51.
2. Sudarsono, Agus P, Didik G dkk. Tumbuhan obat. Yogyakarta: BP UGM; 1996.
3. Sam T W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In: Colegate SM, Molyneux RJ, editors. Bioactive natural products detection, isolation, and structural determination. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p. 442-56.
4. Mayer BNNR, Ferrigni ML. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. J Planta Med Res 1982;45:31-4.
5. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology. [Online]. 2002 Sept 23 [cited 2007 Aug 29];[13 screens]. Available from: URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6570/2/17>.
6. Pisutthanan S, Plianbangchang P, Pisutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family meliaceae. Naresuan University Journal 2004;12(2): 13-8.

7. Zhao G, Hui Y, Rupprecht JK, McLaughlin JL, Wood KV. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *J Nat Prod* 1992;55: 347-56.
8. Rieser MJ, Gu ZM, Fang XP, Zeng L, Wood KV, McLaughlin JL. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1996;59: 100-8.
9. Mongelli E, Pomilio AB, Sanchez JB, Guerra FM, Massanet GM. ent-Kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phyt Res* 2002; 16: 387-8.
10. Salmon SE, Sartorelli AC. Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 8th ed. San Francisco: Prentice Hall International; 2001. p. 923-6.
11. Hasballah K, Murniana, Al Azhar. Aktivitas antibakteri ekstrak daun *Eclipta alba* L. Hassk serta ekstrak dan minyak atsiri daun *Piper betle* L. terhadap bakteri penyebab karies gigi. *Jurnal Kedokteran Yarsi* 2005;13(3):281-7.
12. Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethyl bez(a)anthracene-, bezo(a)pyrene-, 3-methyl cholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosurea- induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 1988;48:2361-5.

13. Nugroho T. Pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) dan ekstrak sirih (*Piper betle* Linn) terhadap viabilitas tumor adenocarcinoma mammae mencit C3H secara in vitro. Tesis. Program Magister Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro. Semarang. 2003.
14. McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL, 1993. Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumour compounds. In: Kinghorn AD, Balandrin MF, editors. Human medicinal agents from plants. Washington, D. C.: ACS Symposium 534, American Chemical Society; p. 112-37.
15. Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Hsin ST, Subbaraju GV. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. Int J Appl Sci Eng 2005; 3(2):125-34.
16. Demeule M, Levesque JM, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J et al. Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. [Online]. Curr. Med. Chem. – Anti Cancer Agents 2002;2:441-63. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jan 17].
17. Brownson DM, Azios NG, Fuqua BK, Dharmawardhane SF, Malbry TJ. Flavonoid effects relevant to cancer. J Nutr [serial online] 2002 November [cited 2008 Feb 27]; 132:3482S-9S. Available from: URL: <http://www.labdiet.com>
18. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds.

[Online]. IUBMB Life 2000;50:167-71. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jan 17].

19. Shih A, Davis FB, Hung YL, Davis PJ. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via MAPK- and p53- dependent mechanism. J Clin Endocrinol Metab [serial online] 2002 [cited 2008 Feb 27]; 87(3):1223-32. Available from: URL:<http://jcem.endojournals.org/cgi/alerts/etoc>

20. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induces activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. Cancer Res [serial online] 2001 [cited 2008 Feb 28]; 61:1604-10. Available from: URL:<http://cancerres.aacrjournals.org/>

21. Tinhover I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G et al. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. FASEB J [serial online] 2001 [cited 2008 Februari 28]; 15:1613-15. Available from: URL: <http://www.fasebj.org/>

22. Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler: oksidan, antioksidan, dan radikal bebas. Jakarta: Infomedika; 2000. p. 31-46.