

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KULIT JERUK PURUT (*Citrus hystrix*)
PADA SEL HeLa *CERVICAL CANCER CELL LINE***

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF KEFIR LIME (*Citrus hystrix*) in HeLa CELL *CERVICAL
CANCER CELL***

Joshua Nathanael¹, Nastiti Wijayanti², dan P. Kianto Atmodjo¹

¹Fakultas Teknobiologi, UAJY, Jl. Babarsari No. 44, Yogyakarta – 55281

²Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta

ABSTRAK

Citrus hystrix atau jeruk purut di Indonesia belum banyak dimanfaatkan sebagai obat. Ekstrak etanolik kulit buah jeruk purut sampai saat ini belum diteliti sifat sitotoksiknya terhadap sel HeLa, sementara ekstrak daun jeruk purut telah banyak digunakan. Pada penelitian ini digunakan kulit buah jeruk purut yang diekstraksi dengan pelarut etanol. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui golongan senyawa yang ada pada ekstrak etanolik kulit jeruk purut dan mengetahui kemampuan sitotoksik ekstrak etanolik kulit buah jeruk purut pada sel HeLa. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada kulit buah jeruk. Dari analisa KLT diperoleh hasil bahwa ekstrak etanolik kulit jeruk purut mengandung Alkaloida, flavonoida, terpenoid, tanin, dan saponin. Metode MTT *assay* digunakan untuk menguji efek sitotoksik ekstrak etanolik kulit buah jeruk purut. Dari hasil MTT *assay* didapatkan IC_{50} ekstrak sebesar 873,277 $\mu\text{g/mL}$, Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik kulit jeruk purut tidak bersifat toksik pada sel HeLa.

ABSTRACT

Citrus hystrix or know as kefir lime in Indonesia were not used as medicine. Kefir lime were more used as skin and body treatment rather as food composition. The research of cytotoxic effect on HeLa from ethanolic extract of kefir lime peels is never been done before, ethanolic extract of kefir lime peels were used on this research. The point of this research is to know the main compound that built ethanolic extract of kefir lime peels and to know the cytotoxic effect of ethanolic extract from kefir lime peels. Thin layer chromatography (TLC) were being used to identify the secondary metabolites in citrus peels extract. From the TLC Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanin, and Saponin, were identified. The method that being used to identify the cytotoxic effect of citrus peel extract in this research were MTT *assay*. From the MTT *assay* we can obtain the IC_{50} of the sample. The IC_{50} of this Kefir lime peel extract is 873,277 $\mu\text{g/mL}$.

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki berbagai ragam flora yang tumbuh di hutan hujan tropis. Salah satu tanaman yang banyak dijumpai di beberapa wilayah Indonesia adalah tanaman dari Suku rutaceae. Rutaceae terdiri dari 130 marga yang terdapat di dalam tujuh subsuku (Rahmi *et al* 2013).

Salah satu spesies dari Suku rustaceae adalah *Citrus hystrix* atau jeruk purut. Di Indonesia daun jeruk purut digunakan sebagai bumbu masak. Buahnya lebih banyak digunakan untuk perawatan tubuh dan kulitnya digunakan untuk makanan. Kulit buah ini dapat dimanfaatkan untuk bahan shampoo pencuci rambut (Rahmi, 2013).

Jeruk purut mengandung flavanoid, karotenoid, limonoid dan mineral. Flavanoid utama dalam jeruk adalah naringin, narirutin, dan hesperidin yang terdapat pada kulit buah, dan bulir-bulir daging buah jeruk. Flavanoid berfungsi sebagai bahan anti oksidan yang mampu menetralkan oksigen reaktif dan berkontribusi terhadap pencegahan penyakit kronis seperti kanker (Devy *et al.*, 2010).

Kanker adalah kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal yang tidak terkendali. Ada empat faktor utama penyebab kanker seperti lingkungan, makanan, biologis dan psikologis (Lumongga, 2008). Telah lama manusia memerangi kanker dan sebagian besar pasien pengidap kanker akan mendapatkan kemoterapi yang melibatkan pemakaian obat anti kanker dan obat pendukung untuk mengurangi efek samping pemakaian obat anti kanker (Duran *et al.*, 2006), salah satu obat anti kanker adalah doksorubisin, namun penggunaan doksorubisin dalam jangka waktu yang panjang telah dilarang karena bersifat racun bagi organ-organ penting (Kumar *et al.*, 2012). Oleh karena itu banyak dikembangkan penelitian untuk mencari senyawa antikanker lain yang bersifat alami guna meminimalisir efek samping dari obat anti kanker tersebut.

Salah satu metode pengujian senyawa yang berpotensi sebagai antikanker adalah dengan pengujian sitotoksik dan sejauh ini belum pernah dilakukan penelitian uji sitotoksisitas ekstrak kulit jeruk purut pada sel kanker serviks. Oleh karenanya diperlukan pengujian efek sitotoksik ekstrak etanolik dari kulit jeruk purut terhadap sel HeLa sebagai model sel kanker serviks.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, *vacuum filter*, saringan, *waterbath*, erlenmeyer, oven, gelas beker, lemari pendingin, blender, rotary evaporator, mikropipet, inkubator CO₂, *inverted microscope*, serta *ELISA reader*.

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah parutan kulit jeruk purut (*Citrus hystrix*), serta etanol sebagai pelarut. Sedangkan bahan yang digunakan untuk menguji sitotoksitas adalah kultur sel HeLa, medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, penstrep, fungizon, *plate 96 wells*, kertas saring, microtube, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *methyl-thiazolyl-tetrazolium* (MTT), *sodium dodecyl sulfate* (SDS), 1% HCl 0,1N, serta Doksorubisin.

Cara kerja

Ekstraksi jeruk purut diawali dengan memilih jeruk dengan karakteristik tua, berwarna hijau gelap, segar dan tidak ditemukan penyakit di kulit jeruk. Jeruk purut yang didapatkan dicuci dengan air mengalir, kemudian dipotong dan diambil kulit bagian luar, dikeringkan menggunakan oven selama 12 jam dengan suhu 40°C, kemudian dihaluskan dengan blender kering. Sebanyak 50g sample diekstrak dalam 250ml etanol teknis 96% digojok dan ditutup rapat menggunakan kertas payung, kapas dan karet gelang. Setelah dimaserasi selama 24 jam, filtrat disaring dan residunya dimaserasi kembali dengan etanol teknis 96% dengan cara yang sama. Maserasi diulang sebanyak tiga kali dan kemudian masing-masing filtrat pada setiap ulangan dikumpulkan menjadi satu dalam *elenmeyer* yang tertutup rapat. Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator selama 35 menit, suhu 60° C, 80 rpm, ekstrak di tampung diatas cawan porselen, dikeringkan dengan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak dengan berat konstan. Ekstrak tersebut kemudian di timbang dengan menggunakan timbangan analitik dan disimpan di freezer hingga digunakan. (Chueahongtong *et al* (2011) yang dimodifikasi oleh Setyawati (2013))

Analisis fitokimia dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Lima jenis senyawa yang dideteksi secara kualitatif, adalah flavonoida, alkaloida, terpenoida, saponin, dan tanin.

Uji aktifitas sitotoksik dilakukan dengan mengkultur Sel HeLa dengan medium lengkap pada kultur flask, dengan penggantian medium dilakukan setiap dua hari sekali. Pemeliharaan sel HeLa dilakukan dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Pemanenan sel HeLa dilakukan

apabila sel sudah konfluen yaitu meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi *tissue disk*.

Sebelum dipanen, sel dicuci menggunakan RPMI 1640 sebanyak tiga kali, lalu diberi tripsin sebanyak 0,5 mL per flask. Sel dibiarkan terlepas dari dasar flask sambil digoyang pelan-pelan sesekali. Apabila sel sudah terlepas, sel dipindah ke konikel 15 mL yang berisi medium lengkap, dan disentrifus selama 5 menit, 3000 rpm. Setelah disentrifus, medium dibuang, diganti dengan medium lengkap yang baru dan dihomogenasi menggunakan vortex, lalu dihitung kerapatan selnya menggunakan hemositometer.

Sebanyak 50 μ L suspensi sel ditambah 900 μ L medium lengkap dan ditempatkan pada *microtube*, kemudian dihomogenasi menggunakan vortex. Selanjutnya, diambil sebanyak 10 μ L suspensi sel diteteskan pada hemositometer dan dihitung jumlah selnya di bawah *inverted microscope*. Setelah kerapatan sel diketahui, maka dapat dihitung volume sel yang harus diambil sesuai kebutuhan. Sel yang digunakan untuk pengujian ditempatkan pada tabung konikal 50mL, ditambah medium lengkap sesuai perhitungan, dan dihomogenasi menggunakan vortex. Sel HeLa yang telah disiapkan dikultur dengan kerapatan 2×10^4 sel/ sebanyak 100 μ L/ sumuran. Sel kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama semalam.

Pada akhir masa inkubasi, masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L MTT (5mg dalam 1 mL PBS + 10 mL medium lengkap). Sebelum diberi MTT, medium dalam sumuran dibuang. Setelah MTT, suspensi diinkubasi pada suhu 37°C, CO₂ 5%, selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan penambahan SDS1% dalam 0,1N HCl sebanyak 100 μ L/sumuran. Nilai absorbansi dibaca dengan ELISA reader $\lambda=550$ nm setelah didiamkan pada ruangan gelap pada suhu kamar selama semalam.

Analisis Data

Persentase penghambatan sel yang diperoleh dianalisis dengan *Oneway ANOVA* dilanjutkan dengan *TUKEY HFD Test* untuk mengetahui beda nyata antar konsentrasi perlakuan. Kemudian dari persentase penghambatan ditentukan nilai IC 50 ekstrak menggunakan analisis probit. *Oneway ANOVA* dan analisis probit ditentukan menggunakan program SPSS Statistics 17.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi Kulit Buah Jeruk Purut.

Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis bahan yang diekstrak. Kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tergantung dari gugus-gugus yang terikat pada pelarut tersebut. Pelarut yang mempunyai gugus hidroksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk pelarut polar, sedangkan hidrokarbon termasuk ke dalam non polar. Pemilihan pelarut harus didasarkan pada sifat polaritas, dan stabilitas (Nurmillah, 2009).

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Maserasi adalah sebuah proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan. Senyawa metabolit yang terdapat pada kulit jeruk purut dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (Putri, 2013). Rahmi *et al* (2013) mengemukakan bahwa kulit jeruk purut memiliki kandungan metabolit tertinggi pada ekstrak etanolik, oleh karena itu etanol digunakan dalam penelitian ini.

2. Analisis Kualitatif Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Purut

Pada penelitian ini dilakukan analisis kualitatif kandungan fitokimia pada ekstrak kulit jeruk purut dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) karena dianggap cukup mudah, akurat, dan cepat. Golongan senyawa yang diuji adalah alkaloida, flavonoida, terpenoida, tannin, dan saponin.

Berdasarkan penelitian Rahmi,*et al* (2013) kulit jeruk purut memiliki kandungan flavonoida dan alkaloida, senyawa ini telah banyak diteliti dan diketahui memiliki potensi sebagai senyawa antikanker (Kanadaswami *et al*, 2005; Lu, *et al*, 2012; Batra, 2013). Rahmi *et al* (2013) juga mengemukakan bahwa kulit jeruk purut selain memiliki kandungan flavonoida, juga memiliki kandungan fenolik dan terpenoida yang paling tinggi dibandingkan dengan bagian lain dari tanaman jeruk purut.

Tabel 1. Analisis kualitatif kandungan fitokimia Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Purut

Golongan senyawa	Kandungan Fitokimia
Alkaloida	+
Flavonoida	+
Terpenoida	+
Tannin	+
Saponin	+

Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa ekstrak etanolik kulit jeruk purut mengandung semua senyawa yang diujikan, hal ini berbeda dengan Rahmi, *et al* (2013) yang tidak menemukan senyawa saponin dan alkaloida. Perbedaan pada hasil yang didapatkan diakibatkan bedanya metode ekstraksi. Sedangkan Setyawati (2013) menemukan bahwa ekstrak daun jeruk purut memiliki kandungan saponin dan alkaloida, hal ini serupa dengan hasil yang didapat dalam penelitian kali ini yang menggunakan kulit buah jeruk purut.

Untuk mengetahui potensi anti kanker pada suatu sampel diperlukan sebuah rangkaian uji, diantaranya adalah uji sitotoksisitas yang merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui sifat toksik dari suatu ekstrak pada sel kanker (Setyawati, 2013). Pada penelitian kali ini uji sitotoksik dilakukan pada kultur sel HeLa.

Kultur sel adalah teknik yang digunakan untuk menumbuhkan sel diluar kondisi alaminya. Kelebihan dari metode kultur sel adalah kebebasan peneliti untuk mengatur kondisi lingkungan tempat hidup pada keadaan konstan. Kekurangan dari metode ini adalah adanya kemungkinan mutasi pada sel yang dikultur. Untuk meminimalisir hal tersebut kondisi lingkungan kultur harus dibuat semirip mungkin dengan lingkungan awal di dalam tubuh supaya sel tumbuh dengan baik (Zarisman, 2006).

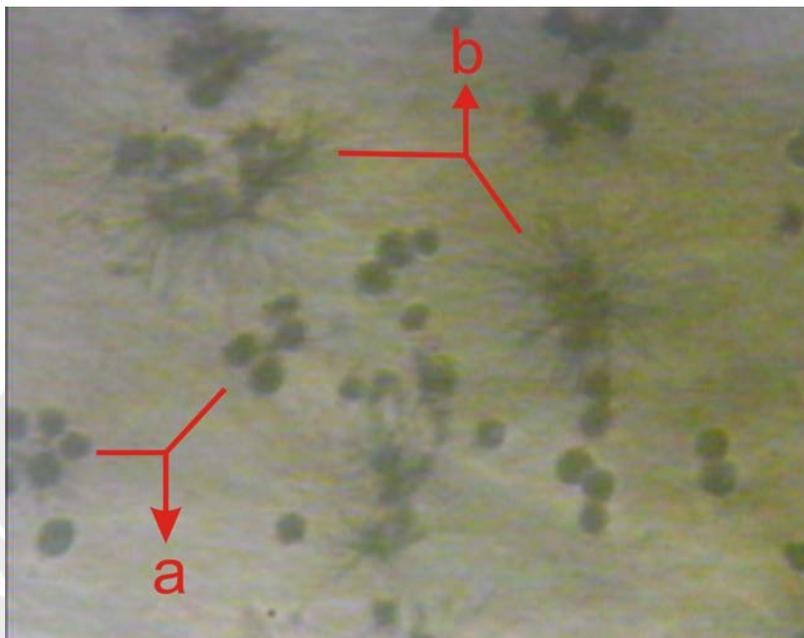
Kondisi sel didalam kultur dipengaruhi oleh medium kultur dan kondisi lingkungan. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah RPMI. RPMI adalah medium yang baik untuk menumbuhkan sel kanker dalam jangka waktu yang pendek (Gusmita 2010). FBS (*Fetal Bovine Serum*) ditambahkan kedalam medium sebagai *growth factor*. FBS adalah suplemen

peningkat pertumbuhan yang sering digunakan karena kompleks dan mengandung banyak faktor pertumbuhan, melindungi sel dan memberi nutrisi. Kandungan tersebut dibagi menjadi beberapa polipeptida spesifik yang memacu pertumbuhan sel, protein transport, *protection agent*, faktor pelekat dan nutrisi. Pada medium RPMI juga ditambahkan penisilin-streptomisin yang bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi bakteri. Penisilin-Streptomisin adalah antibiotik yang tidak bersifat toksik, memiliki spektrum antimikroba luas dan ekonomis (Zarisman 2006).

Jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur tiap sumuran adalah 2×10^5 sel/sumuran. Jumlah sel diharapkan dapat bertahan selama waktu perlakuan (24 - 48 jam). Penentuan waktu inkubasi 24 - 48 jam adalah untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel. Berkurangnya nutrisi dapat disebabkan karena jumlah sel yang terus bertambah sehingga nutrisi yang tersedia tidak mencukupi. Medium RPMI akan berfungsi maksimal dalam mengkultur sel kanker selama dua hari (Zarisman, 2006). Medium yang digunakan dalam tiap sumuran adalah medium lengkap yang berisi RPMI, *Fungizone*, Penisilin-streptomisin, dan FBS.

Dimetil Sulfoksida (DMSO) berfungsi sebagai *solvent* yang meningkatkan kelarutan sample. DMSO adalah sebuah pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan baik senyawa polar dan nonpolar dan larut dalam berbagai pelarut organik maupun air (BPOM, 2010). Dalam penelitian kali ini DMSO digunakan untuk membantu melarutkan ekstrak dalam medium.

Pada penelitian ini dilakukan MTT assay untuk menguji sifat toksisitas senyawa uji . MTT adalah garam tetrazolium yang direduksi menjadi produk formazan dengan mereduksi kehadiran enzim hanya pada sel yang aktif secara metabolik (Jabbar, *et al.*, 1989), pada penelitian kali ini juga terbentuk kristal formazan (Gambar 2).



Gambar 1. Dokumentasi sel HeLa setelah pemberian MTT yang diamati dengan mikroskop inverted perbesaran 10x10: (a)Sel Mati (b) Sel Sehat

Reaksi MTT dengan enzim mitokondria reduktase yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan Sodium Dodesil Sulfat (SDS). SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana, *et al*, 2010), semakin sehat sebuah sel maka kristal formazan yang dihasilkan akan lebih banyak sehingga warna ungu yang dihasilkan akan lebih pekat, oleh karena itu tingkat sitotoksitas bisa diukur dengan mengukur absorbansi cahaya dengan menggunakan *microplate reader*.

Pada penelitian kali ini dapat dibuktikan bahwa doksorubisin lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan sel HeLa dibandingkan dengan ekstrak. Pada konsentrasi 1,551 $\mu\text{g/mL}$ doksorubisin sudah mampu menghambat 50% pertumbuhan sel HeLa, sedangkan ekstrak etanolik kulit jeruk purut mencapai penghambatan 50% pada konsentrasi antara 800 (48,64%) hingga 900 (51,53%) $\mu\text{g/mL}$.

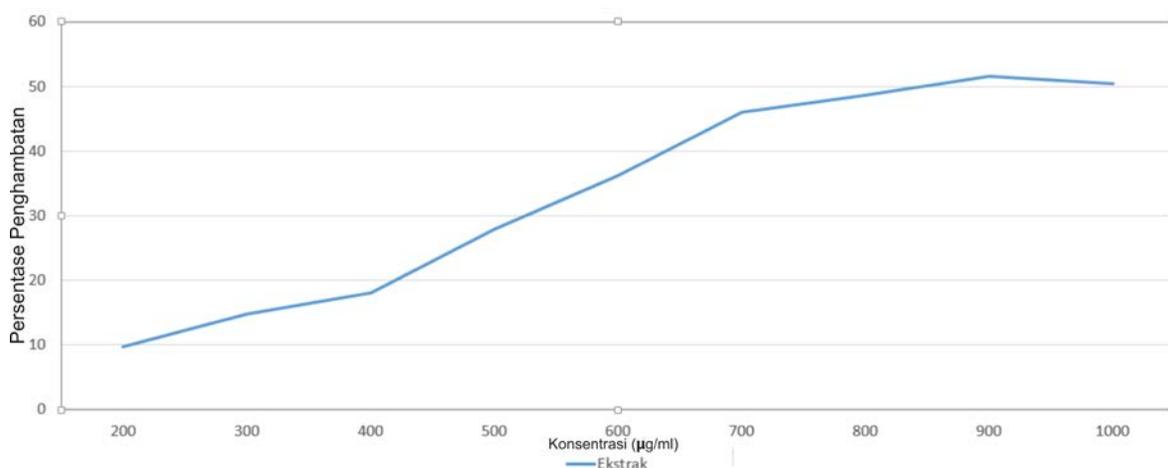
Tabel 2. Sitotoksitas Ekstrak Kulit Jeruk Purut Terhadap Sel HeLa

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)	Persentase Penghambatan (%) Ekstrak Etanolik
1000	$50,49 \pm 0,17^{ab}$
900	$51,53 \pm 0,39^{ab}$
800	$48,64 \pm 0,39^{ab}$
700	$46,07 \pm 0,49^{ab}$
600	$36,23 \pm 0,54^{abc}$
500	$27,84 \pm 2,19^{abc}$
400	$18,03 \pm 2,63^{bcd}$
300	$14,82 \pm 3,54^{cde}$
200	$9,71 \pm 2,25^{cde}$

Keterangan: Huruf di belakang angka menunjukkan bedanya antar persentase penghambatan. Golongan huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata sedangkan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata.

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan *microplate reader* dapat dihitung persentase penghambatan ekstrak etanolik kulit jeruk purut terhadap sel HeLa (Tabel 2) dengan penghambatan kontrol sel sebesar 0%. Berdasarkan grafik pada Gambar 2 dapat disimpulkan bahwa penghambatan ekstrak bersifat linier, yaitu semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar tingkat penghambatannya.

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan *microplate reader* dapat dihitung persentase penghambatan ekstrak etanolik kulit jeruk purut terhadap sel HeLa (Tabel 2). Berdasarkan grafik pada Gambar 2 dapat disimpulkan bahwa penghambatan ekstrak bersifat linier, yaitu semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar tingkat penghambatannya. Penghambatan sel dari konsentrasi terkecil 200 $\mu\text{g/mL}$ hingga konsentrasi terbesar 1000 $\mu\text{g/mL}$ terus mengalami peningkatan.



Gambar 2. Sitotoksitas ekstrak jeruk purut terhadap sel HeLa

Tabel 3. Sitotoksitas kontrol Positif Doksorubisin

Konsentrasi Doksorubisin (µg/mL)	Persentase Penghambatan (%)
50	82,29 ± 0,49 ^a
25	84,6 ± 0,49 ^a
12,5	79,95 ± 1,15 ^{ab}
6,25	55,65 ± 6,14 ^{def}
3,125	49,41 ± 11,03 ^{efg}
1,551	50,16 ± 9,57 ^{fgh}

Keterangan: Huruf di belakang angka menunjukkan bedanyata antar persentase penghambatan. Golongan huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata sedangkan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata.

Bila dibandingkan penghambatan yang dilakukan oleh ekstrak (Tabel 2) dan Doksorubisin (Tabel 3) maka dapat disimpulkan bahwa penghambatan yang dilakukan ekstrak etanolik kulit jeruk purut sangat rendah.

Berdasarkan hasil pada Tabel 4 dan 5 dihitung *Inhibitory Concentration* (IC₅₀) dari ekstrak dan doksorubisin, yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 50%, dihitung dari kurva regresi linier antara log konsentrasi zat uji dengan nilai probit aktivitas penghambatan (Agustini, 2012).

Pada penelitian ini didapatkan IC₅₀ ekstrak sebesar 873,277 µg/mL sedangkan IC₅₀ doksorubisin sebesar 1,546 µg/mL. Ampasavate *et al.* (2010) dalam Setyawati (2013) menggunakan standar suatu bahan bersifat sitotoksik apabila nilai IC₅₀ < 100 µg/mL.

Berdasarkan Ampasavate dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik kulit jeruk purut tidak bersifat toksik bagi sel HeLa

SIMPULAN

Ekstrak etanolik kulit jeruk purut mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, terpenoid, tannin, dan saponin. Uji sitotoksik menunjukkan ekstrak etanolik jeruk purut ($IC_{50} = 873,277 \mu\text{g/mL}$) tidak bersifat toksik terhadap sel HeLa. Ekstrak memberikan penghambatan tertinggi sebesar 51,53% pada konsentrasi $900 \mu\text{g/mL}$ dan penghambatan terendah sebesar 9,71% pada konsentrasi $200 \mu\text{g/mL}$

SARAN

Pada penelitian kali ini ekstrak etanolik kulit jeruk purut terbukti tidak memiliki efek sitotoksik, oleh karena itu disarankan untuk penelitian lanjutan metode ekstraksi perlu disempurnakan dan perlu diteliti lebih lanjut dengan menggunakan pelarut yang berbeda. Efek sitotoksik pada sel lain masih belum diketahui sehingga disarankan agar diujikan pada sel yang berbeda. Jenis kandungan fitokimia pada kulit jeruk purut juga harus diidentifikasi lebih spesifik dan diuji hubungan sitotoksitas tiap senyawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini , N. W. S. 2012. *Aktivitas Antioksidan Dan Uji Toksisitas Hayati Pigmen Fikobiliprotein Dari Ekstrak Spirulina Platensis* . Seminar Nasional IX pendidikan biologi FKIP UNS. Surakarta, Indonesia
- Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. 2010. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *Afr J Pharm Pharmacol*; 4(1): 13-21.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. BPOMRI. Jakarta. Indonesia
- Batra, P., Sharma, A. 2013. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotech* . DOI 10.1007/s13205-013-0117-5
- Chueahongthong, F., Ampasavate.C, Okonogi S., Tima S., Anuchapreeda S. 2011. Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix*, DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(14): 3097-3105.

- Duran I, Siu LL, Chen EX, Oza AM, Sturgeon J, Chin SF. 2006. Phase I trial of gemcitabine, doxorubicin and cisplatin (GAP) in patients with advanced solid tumors. *Anticancer Drugs*. 17: 81-87.
- Gusmita, D. 2010. *Uji sitotoksisitas ekstrak etanol spons Callyspongia sp. dan fraksi-fraksinya terhadap sel lestari tumor HeLa*. Skripsi. Universitas Pancasila, Bogor, Indonesia
- Jabbar S.A.B., P.R. Twentyman & J.V. Watson. 1989. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *Br., Journal of Cancer*. 60: 523-528
- Kanadaswami, Chitan., Lung-Ta Lee, Ping-Ping H Lee, Jiuan-Jiuan Hwang, Ferng-Chun Ke. Ying-Tung Huang, And Ming-Ting Lee. 2005. The Antitumor Activities of Flavonoidas. *In vivo* . Vol 19.
- Lumongga, F. 2008. Apoptosis. *USU (Universitas Sumatera Utara) Repository*. Medan.
- Lu, Jin-Jian., Bao, Jiao-Lin., Chen Xiu-Ping., Min Huang, and Wang Yi-Tao. 2012. Alkaloidas Isolated from Natural Herbsas the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2012. Macao, China
- Maulana, R., Adriyana. Hafida, E. Putri, J. K. Noviyanti, F. Murti, S. R. & Zetina, Z. 2010. *Isolasi DNA tanaman dan elektroforesis DNA*. Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jakarta Indonesia.
- Nurmillah, O. Y. 2009. *Kajian aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak biji, kulit buah, batang dan daun tanaman jarak pohon (Jatropha curcas L.)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Teknologi Bogor, Bogor.
- Rahmi U, Yunazar M., dan Adlis S. 2013. Profil Fitokimia Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Antioksidan Tanaman Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) dan Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr). *Jurnal Kimia Unand* (ISSN No. 2303-3401), hal : 109-114
- Setyawati, Yunita. 2013. *Sitotoksisitas dan Apoptosis Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus hystrix D.C.) terhadap Sel HeLa (Human Cervical Cancer Cell Line)*. Skripsi. Fakultas Biologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta
- Zairisman, S. Z. 2006. *Potensi immunomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk substandar secara in vitro pada sel limfosit manusia*. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor, Bogor: I + 74 hlm.