

Uji Sitotoksik Ekstrak Buah *Phaleria macrocarpa* terhadap Sel Kanker Lestari A 549 dan THP-1

PERTAMAWATI KARTAKUSUMAH^{1*}, SUSI KUSUMANINGRUM¹,
HENDIG WINARNO²

¹Pusat P2 TFM – BPPT

Gedung II BPPT Lantai 15, Jl. MH. Thamrin No.8 Jakarta Pusat 10340

²P3 TIR-Deputi Bidang Penelitian Dasar & Terapan BATAN

Diterima 6 Januari 2006, Disetujui 9 Februari 2006

Abstract: Fruits of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) has been used to cure various health problems, including empirical treatment for cancer. The therapeutic effect of natural material is related to the chemical compound contains. In fruits of *Phaleria macrocarpa*, various chemicals are present such as alkaloid, flavonoid saponin, fenol and tannin, which showed anticancer activity, as well as unknown compounds which ones presumably supportive for cancer treatment. An *in vitro* experiment is therefore set up with the objective of examining the effect of fruit extract on male human lung carcinoma epithelial cells (A-549 cell line) and human peripheral blood leukemia acute cells (THP-1 cell line). Various concentrations: 5, 10, 25, 50 and 100 ppm of fruit extract were evaluated. Observations were made 72 hour after incubating A-549 cells and THP-1 cells in each treatments. The results showed that fruit might inhibit the growth of A-549 cells and THP-1 cells. Inhibitory concentration (LC_{50}) of fruit extract after 72 hours of incubation is 9,43 ppm for A-549 cells and 5,36 ppm for THP-1 cells. Inhibitory potential effect of these fruits in THP-1 cells are better than in A-549 cells. The effect might be associated to the active compounds contained in these material.

Key words: citotoxicity, A-549 cell line, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl., THP-1 cell line

PENDAHULUAN

Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) secara empiris telah banyak digunakan untuk mengatasi berbagai macam keluhan dan penyakit, salah satu di antaranya ialah penyakit kanker yang saat ini masih menempati urutan atas penyebab kematian dan sangat ditakuti orang. Penggunaan buah Mahkota Dewa untuk pengobatan terhadap penyakit kanker memberikan hasil yang cukup memuaskan. Untuk itu dilakukan penelitian secara ilmiah untuk mengetahui efek toksik buah mahkotadewa terhadap sel-sel kanker lestari (*cell line*) A-549 dan THP-1⁽¹⁾.

Mahkota Dewa termasuk dalam familia Thymelaceae yang kulit buahnya diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, fenol, tanin dan lainnya. Di antara senyawa-senyawa tersebut, flavonoid mempunyai bermacam-macam efek, seperti efek antitumor, anti HIV, imunostimulan, antioksidan, analgesik, antiradang (antiinflamasi),

antivirus, antibakteri, anti-fungal, antidiare, antihepatotoksik, antihiperlipidemik, dan sebagai vasodilator. Dikatakan pula bahwa senyawa saponin yang terlihat sebagai larutan berbuih dan diklasifikasikan oleh struktur aglikon ke dalam triterpenoid dan steroid saponin, mempunyai efek anti inflamasi, analgesik, dan sitotoksik. Senyawa fenol ataupun polifenol merupakan kelompok yang sangat luas dari metabolit sekunder tanaman seperti komponen fenolik sederhana, tanin, kuinon, antosianin, dan lain-lain, di mana masing-masing senyawa mempunyai efek yang berguna terhadap pengobatan penyakit kanker, seperti tanin yang mempunyai efek antikanker dan antivirus (HIV), sedangkan senyawa antosianin mempunyai efek yang sangat menunjang untuk penyembuhan kanker seperti efek anti edema^(2,3,4).

Sel kanker lestari (*cell line*) A-549 merupakan sel-sel epitel kanker paru-paru manusia. Pertama kali dibiakan pada tahun 1972 dari lelaki kaukasia berumur 58 tahunan. Sel ini juga banyak ditemukan dalam penyakit pernapasan atau infeksi viral seperti asma maupun adanya kerusakan jaringan sehubungan dengan pencemaran oleh asbes atau penyakit lain

* Penulis korespondensi, Hp. 08129676582,
e-mail: pertamawatikartakusumah@yahoo.com

sebagai akibat merokok. Sel-sel A-549 juga digunakan sebagai sistem model untuk mempelajari mekanisme secara molekuler selama terjadinya migrasi sel malignan⁽⁶⁾.

Sel kanker lestari THP-1 merupakan neoplasma ganas sel darah putih (leukemia). Pertamakali diinisiasi dari bagian perifer darah anak lelaki berumur sekitar 1 tahun dengan kasus AML (*Acute Monocytic Leukemia*) yang jatuh sakit pada tahun 1978. Sel-sel THP-1 merupakan sel-sel lepas (tidak bergerombol) dalam suspensi, juga dimanfaatkan untuk mempelajari berbagai ilmu lainnya, untuk mendeskripsikan produksi lisosim dan bakal fagositik yang ditandai sebagai *human with IEF of AST, MDH, NP*⁽⁷⁾.

Uji BSLT (*Brime Shrimp Lethality Test*) dengan menggunakan hewan uji udang renek *Artemia salina* Leach merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa anti-kanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksisitas diketahui dari jumlah kematian *Artemia salina* Leach karena pengaruh senyawa bahan alam tumbuhan dengan dosis yang telah ditentukan, dilakukan dengan menentukan besarnya nilai LC_{50} selama 24 jam. Suatu ekstrak atau senyawa tanaman yang memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ dapat diduga memiliki efek sitotoksik⁽⁹⁾.

Kandungan berbagai senyawa aktif dalam buah Mahkota Dewa diduga berpengaruh (sitotoksik) terhadap sel kanker lestari A-459 dan sel THP-1, sehingga diharapkan hasil percobaan yang diperoleh berguna untuk menambah perbendaharaan ilmiah tentang tanaman Mahkota Dewa. Buah Mahkota Dewa yang telah digunakan secara empiris dapat terbukti benar-benar merupakan bahan alam asli yang ber-khasiat dan berguna untuk pengobatan alternatif penyakit kanker, mudah didapat, murah harganya dan terjangkau oleh masyarakat

Penelitian ini merupakan penelitian awal yang dilakukan secara eksperimental *in vitro*. Konsentrasi ekstrak buah Mahkota dewa yang digunakan ialah 5, 10, 25, 50 dan 100 bpj, kontrol positif doksorubisin yang digunakan ialah 5 bpj; diujikan terhadap sel A-549 dan sel THP-1 dengan indikator biru tripan. Pengamatan dilakukan pada 72 jam setelah sel A-549 dan sel THP-1 diberi perlakuan dan diinkubasi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan utama penelitian yaitu buah Mahkota Dewa yang berasal dari tanaman yang tumbuh di daerah Bogor. Buah diidentifikasi dan determinasi di Pusat Penelitian Biologi LIPI – Bogor. Buahnya dipilih yang telah matang dan berwarna merah menyala, selanjutnya buah diekstraksi dengan

menggunakan pelarut etanol. Untuk pengujian awal formula antikanker digunakan uji BSLT dengan bahan uji udang renek *Artemia salina* Leach yang dibiakkan dalam air bergaram laut, sedangkan pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* menggunakan sel kanker lestari A-549 (sel kanker paru-paru) dan THP-1 (sel kanker darah leukemia). Berbagai bahan kimia yang digunakan dalam pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* antara lain ialah nitrogen cair, DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), serum FBS (*Fetal Bovine Serum*), antibiotik (Streptomisin-Penisilin), DMSO, air suling dan biru tripan.

Peralatan yang digunakan antara lain peralatan gelas, peralatan ekstraksi, peralatan uji letalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT) dan peralatan uji aktivitas terhadap sel kanker lestari A-549 dan THP-1.

METODE. Pembuatan ekstrak buah Mahkota Dewa. Buah Mahkota Dewa dikeringkan dalam oven bersuhu 40°C sampai kering (kadar air 3-6%), lalu dihaluskan. Serbuk buah Mahkota Dewa lalu direndam dalam pelarut etanol. Ekstrak cair yang dihasilkan dihilangkan pelarut etanolnya dengan alat pengering berputar (*rotavapor*) sampai diperoleh ekstrak kental buah Mahkota Dewa, selanjutnya ekstrak kental dikeringkan lebih lanjut dalam desikator sampai diperoleh ekstrak kering buah Mahkota Dewa⁽⁸⁾.

Penentuan konsentrasi ekstrak dan uji letalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT). Terhadap botol-botol uji yang berisi masing-masing ekstrak kental buah Mahkota Dewa 5, 10, 25, 50 dan 100 bpj dilakukan uji BSLT dengan menggunakan udang renek *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach ditetaskan dari telur dalam larutan garam dengan salinitas sekitar 33%. Media penetasan telur tersebut diberi aerasi udara dan disinari dengan cahaya lampu. Proses penetasan tersebut dilakukan selama 48 jam. Pengujian BSLT dilakukan dalam 3 waktu berbeda dengan 3 kali ulangan. Hasil uji letalitas berupa nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*), selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan konsentrasi untuk pengujian terhadap sel kanker lestari A-549 dan THP-1. Ke dalam botol uji yang berisi ekstrak kering buah Mahkota Dewa dengan konsentrasi antara 5 sampai 100 bpj dimasukkan 1 ml larutan garam dan 20 μl DMSO untuk membantu kelarutan ekstrak tersebut. Setelah ekstrak larut, dimasukkan 20 ekor *Artemia salina* Leach dan ditambahkan larutan garam hingga volume 5 ml. Pengamatan terhadap *Artemia salina* yang mati dilakukan setelah 24 jam. Perbandingan negatif (blanko negatif) dibuat dalam botol uji hanya dengan penambahan 20 μl DMSO.

Uji BSLT dilakukan dengan 3 ulangan⁽⁹⁾.

Uji aktivitas terhadap sel kanker lestari A-549 dan THP-1. Preparasi medium pertumbuhan. Medium tumbuh digunakan 1 kemasan DMEM/F12 (1,2 g) dalam 1 l air suling steril dan ditambah 1,2 g/l NaHCO₃. Ke dalam 100 ml medium pertumbuhan ditambahkan 10% serum FBS, 100 IU/ml Penisilin dan 100 mg/ml antibiotik Streptomisin. Selanjutnya medium disterilisasi dengan pompa vakum atau dengan filterisasi (filter diameter 0,1/0,2 µm) dan siap digunakan untuk pengujian.

Preparasi ekstrak buah Mahkota Dewa. Ekstrak sampel dalam tabung eppendorf yang telah ditentukan konsentrasinya setelah dikeringkan lalu ditambah 960 µl medium tumbuh dan 40 µl DMSO untuk membantu kelarutan.

Preparasi sel kanker lestari A-549 dan THP-1. Sel kanker lestari A-549 dan THP-1 dalam tabung eppendorf disimpan dalam tabung nitrogen cair (*cryopreservation*), setelah diambil dari alat tersebut lalu dihangatkan dengan tangan sampai mencair. Selanjutnya medium dalam tabung eppendorf dibuang sehingga sel akan terlihat menempel di dinding tabung, lalu bilas dengan sedikit larutan PBS (1 ml), kocok-kocok sebentar untuk menghilangkan serum lalu larutan PBS dibuang. Selanjutnya tambahkan media PBS lalu disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Endapannya diambil dan masukkan dalam tabung eppendorf baru dan tambahkan 10 ml medium pertumbuhan, dihomogenkan dengan vortex dan siap digunakan untuk uji aktivitas.

Pengujian aktivitas ekstrak. Pekerjaan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet*. Konsentrasi ekstrak yang digunakan ialah 6, 12, 24, 48 dan 96 bpj. Ekstrak buah Mahkota Dewa dilarutkan dalam medium dengan volume tertentu dan ditambahkan 40 µl DMSO/ml untuk membantu kelarutan. Ke dalam lubang uji *Disposable Plate* ditambahkan 800 µl medium, 100 µl larutan ekstrak yang diuji dan 100 µl sel A-549 dan sel THP-1 yang telah dihomogenkan. Cawan uji diinkubasi selama 72 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu kamar. Pengujian aktivitas ekstrak buah Mahkota Dewa terhadap 2 jenis sel kanker tersebut dilakukan dengan 3 kali ulangan dan setiap ulangan dilakukan 3 kali pengamatan.

Pengamatan pertumbuhan sel A-549 dan THP-1. Setelah hari ke 3 (72 jam) cawan uji dikeluarkan dari inkubator dan dibuang mediumnya. Setelah ditambahkan 1 ml medium pertumbuhan baru dan dihomogenkan, ini disebut sebagai larutan uji. Ke dalam cawan uji yang lebih kecil dipipet 90 µl larutan uji dan ditambah 10 µl biru tripan, lalu dihomogenkan kembali. Larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan jumlah

sel di bawah mikroskop. Sebagai kontrol negatif dilakukan tanpa penambahan larutan ekstrak.

Perhitungan EC (Effective Concentration) Ekstrak terhadap sel HeLa. Perhitungan EC secara analisis probit, dilakukan apabila telah tercapai jumlah sel yang sama pada konsentrasi ekstrak secara berturut-turut. Hal ini dilakukan untuk menghindari kesalahan perhitungan jumlah sel yang mati bukan karena konsentrasi senyawa dalam ekstrak tetapi karena jumlah (konsentrasi) ekstrak yang berlebihan⁽¹⁰⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi ekstrak dan Uji BSLT. Hasil percobaan memperlihatkan bahwa dengan menggunakan konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa 5, 10, 25, 50 dan 100 bpj diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 8,23 bpj, artinya dengan konsentrasi ekstrak buah mahkotadewa sebesar 8,23 mg/l larutan dapat mematikan 50% *Artemiasalina* Leach dalam percobaan.

Nilai LC₅₀ dalam uji BSLT yang diperoleh dalam percobaan ini relatif lebih baik daripada nilai LC₅₀ yang diperoleh dalam percobaan Triana H dan Silvia UTP dengan menggunakan ekstrak kult batang mahkotadewa, dalam percobaan tersebut diperoleh nilai LC₅₀ seperti yang tertulis dalam Tabel 1⁽¹¹⁾.

Tabel 1. Nilai LC₅₀ dalam uji BSLT berbagai ekstrak kulit batang Mahkota Dewa

Jenis Ekstrak	Nilai LC ₅₀ (bpj)
Ekstrak air	482 ± 12
Ekstrak metanol	39 ± 3
Ekstrak kloroform	29,6 ± 0,1

Ket.: Hasil uji Triana H. & Silvia UTP⁽¹¹⁾.

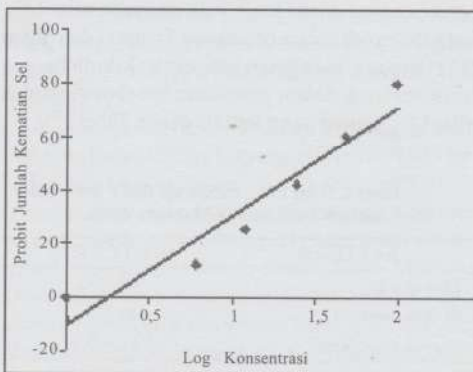
Ekstrak suatu tanaman dikatakan toksik bila nilai LC₅₀-nya lebih kecil dari 1000 bpj⁽⁹⁾. Dari data yang diperoleh dalam percobaan ini maupun yang diperoleh dari percobaan Triana H. dan Silvia UTP, memperlihatkan nilai LC₅₀ yang lebih rendah dari 1000 ppm. Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak etanol buah Mahkota Dewa maupun ekstrak air, ekstrak metanol dan ekstrak kloroform dari kulit batangnya bersifat toksik.

Aktivitas ekstrak terhadap sel A-549 & sel THP-1. Aktivitas ekstrak etanol buah Mahkota Dewa terhadap sel A 549 dan sel THP-1 diperlihatkan dengan nilai LC₅₀. Penetapan nilai LC₅₀ dilakukan dengan menggunakan metode regresi linier, dimana nilai logaritma konsentrasi digunakan sebagai absis (sumbu X) dan nilai probit rata-rata jumlah kematian

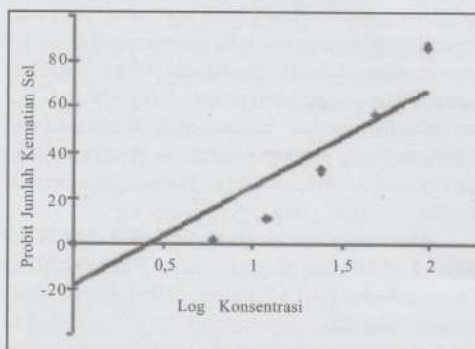
sel sebagai ordinat (sumbu Y). Dari grafik tersebut diperoleh persamaan regresi dengan nilai korelasinya. Grafik probit jumlah kematian sel A 549 terhadap variasi konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota Dewa dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan grafik yang sama untuk sel THP-1 dapat dilihat pada Gambar 2.

Penetapan nilai LC_{50} dari ekstrak etanol buah Mahkota Dewa yang dilakukan dengan menggunakan metode regresi linier terhadap sel A 549 (Gambar 1) memberikan persamaan regresi $Y = 40,834x - 0,196$ dengan nilai korelasi $R^2 = 0,9213$. Dengan menggunakan persamaan garis tersebut diperoleh nilai LC_{50} sel A 549 sebesar 9,43

Penetapan nilai LC_{50} dari ekstrak etanol buah Mahkota Dewa terhadap sel THP-1 (Gambar 2) memberikan persamaan regresi $Y = 43,357x - 18,387$ dengan nilai korelasi $R^2 = 0,7893$. Dengan menggunakan persamaan garis tersebut diperoleh nilai LC_{50} sel THP-1 sebesar 5,36.



Gambar 1. Probit jumlah kematian sel A 549 terhadap variasi konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota Dewa



Gambar 2. Probit jumlah kematian sel THP-1 terhadap variasi konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota Dewa.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah Mahkota Dewa bersifat sitotoksik terhadap sel A 549 dan sel THP-1. Penetapan nilai LC_{50} yang diperoleh berdasarkan persamaan regresi dengan masing-masing nilai korelasinya menunjukkan adanya korelasi positif antara konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota Dewa dengan jumlah kematian sel A 549 ($R^2 = 0,7893$) dan dengan jumlah kematian sel THP-1 ($R^2 = 0,9213$), bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota Dewa berakibat meningkatnya jumlah kematian sel kanker lestari A 549 dan THP-1. Kedua nilai LC_{50} ini juga memperlihatkan kemampuan sitotoksik ekstrak etanol buah Mahkota dewa dengan kategori kuat, mengingat ekstrak tersebut diberikan masih dalam bentuk *crude* ekstrak.

Tabel 2. Nilai LC_{50} untuk sel kanker lestari A-549 dan sel THP-1

Jenis sel	Nilai LC_{50} (bpj)
A-549	9,43
THP-1	5,36

Tabel 2 berikut ini memperlihatkan hasil perhitungan nilai LC_{50} untuk sel kanker lestari A-549 dan sel THP-1 dengan konsentrasi ekstrak sebesar 6, 12, 24, 48 dan 96 bpj dalam percobaan.

Ekstrak buah Mahkota Dewa mengandung berbagai senyawa kimia dengan kadar atau konsentrasi yang berbeda-beda. Berbagai jenis senyawa kimia tersebut bekerja secara spesifik, saling menguatkan bahkan saling melemahkan. Dalam percobaan yang telah dilakukan terlihat bahwa nilai LC_{50} ekstrak buah mahkotadewa terhadap sel THP-1 lebih kecil daripada terhadap sel A-549. Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak buah Mahkota Dewa lebih efektif untuk menghentikan pertumbuhan sel THP-1 sampai 50%, diduga senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak buah Mahkota Dewa dengan konsentrasiyang ada mampu bekerja lebih baik daripada terhadap sel A-549. Perbandingan kekuatan nilai LC_{50} ekstrak buah mahkotadewa terhadap sel

Tabel 3. Nilai LC_{50} ekstrak buah Mahkota Dewa terhadap sel kanker lestari HeLa

Pelarut	Inkubasi	LC_{50} (bpj)	Peneliti
Air	24 jam	196,74	R.Sumastuti & Sonlimar M
Air	48 jam	114,34	
Etanol	24 jam	6,21	Pertamawati
Etanol	72 jam	5,09	Kartakusumah

THP-1 adalah 1,76 kali bila dibandingkan dengan terhadap sel A-549.

Nilai LC_{50} buah Mahkota Dewa yang dicobakan terhadap sel kanker lestari lainnya juga memberikan nilai yang relatif rendah, hal ini memperlihatkan bahwa buah Mahkota Dewa dapat bersifat sebagai antikanker. Dalam percobaan yang telah dilakukan oleh R. Sumastuti dan Sonlimar M. dan juga oleh Pertamawati Kartakusumah (belum dipublikasikan) memberikan hasil seperti tertulis dalam Tabel 3⁽¹²⁾.

Adanya perbedaan nilai LC_{50} dari ekstrak buah Mahkota Dewa dalam percobaan-percobaan tersebut di atas kemungkinan terjadi karena pelarut yang digunakan berbeda, diketahui bahwa pelarut air hanya mampu menyarikan senyawa kimia terutama dari golongan sakharida sedangkan pelarut etanol mampu menyarikan hampir semua senyawa kimia dari semua golongan⁽⁸⁾.

SIMPULAN

Ekstrak etanol buah Mahkota Dewa mempunyai efek antiproliferasi (menghambat proses pembelahan sel) terhadap sel A-549 (sel kanker paru-paru) dan sel THP-1 (sel kanker darah/leukemia). Nilai LC_{50} untuk sel THP-1 lebih kecil daripada nilai LC_{50} untuk sel A-549, dengan perbandingan 1 (sel A-549): 1,76 (sel THP-1). Nilai LC_{50} dari kedua sel kanker lestari yang berbeda tersebut kemungkinan karena berbagai senyawa aktif yang terkandung dalam buah Mahkota Dewa bekerja secara spesifik dan saling menguatkan terhadap kedua sel kanker lestari tersebut.

Perlu dikembangkan penelitian serupa dengan menggunakan ekstrak dari bagian tanaman Mahkota Dewa seperti biji, buah muda, batang/cabang dan akar tanaman yang diduga mengandung senyawa aktif terhadap sel-sel kanker, secara *in vitro* maupun *in vivo* (misalnya pada hewan coba penderita kanker) untuk melihat efek terapi/pengobatannya. Perlu dicari isolat dari senyawa aktif terduga serta diujikan khasiatnya secara *in vitro* maupun *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harmanto N. Sehat dengan ramuan tradisional Mahkota Dewa. Ed 1. Tangerang: PT. Agromedia Pustaka; 2001.hal.31-35.
2. Gotama IBI, Sugiarto S, Nurhadi M, Widiyastuti Y, Wahyono S, Prapti IJ. Inventaris tanaman obat Indonesia. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 1999.hal.147-148.
3. de Padua LS, Bunyaphatsara N, and Lemmens RHMS. Plant Resources of South East Asia No 12(1). Medical and Poisonous Plants 1. Printed in Bogor Indonesia (PROSEA). Leiden: Backhuys Publishers; 1999.hal.36-48.
4. Willaman JJ. Some biological effects of the Flavonoids. J of the American Pharmaceutical Assoc. 1995; 44: 404-409.
5. Hartati MSW, Wahyuono S, Artama WT. Efek sitotoksitas okandrin, senyawa bioaktif hasil isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. terhadap sel Myeloma. Berkala Ilmu Kedokteran. 2000;32(4).
6. Live Cell Imaging Cell Motility. diambil dari <http://www.microscopyu.com/moviegallery/livecell-maging/>. diakses 6 Desember, 2005.
7. Human, peripheral blood, leukemia acute monocytic. diambil dari <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl4515.html> THP-1. diakses 6 Desember, 2005.
8. Buku Panduan Teknologi Ekstrak, Dirjen POM, Depkes RI; 2000.
9. Meyer BN. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*. 1982; 45: 31-4.
10. Finney DJ. Probit analysis, 3rd ed. New Delhi: Cambridge University Press; 1971.p.333.
11. Triana Hertiani & Silvia Utami TP. Uji toksisitas kulit batang Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Aktif. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2002; hal. 65-70.
12. Sumastuti R dan Sonlimar M. Efek sitotoksik ekstrak buah dan daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) terhadap sel HeLa. diambil dari <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/122002/art-3.htm>. diakses 7 Desember, 2005.