

## Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burn.f) Bedd) Terhadap Sel Vero

<sup>1</sup>Harlyanti Muthma'innah Mashar\*

<sup>1</sup>Jurusan Gizi, Poltekkes Kemenkes Palangka Raya

Email: harlyanti@polkesraya.ac.id

### Abstract

*Incidence and death rates from cancer continue to increase in various countries, including Indonesia. Various attempts through therapies have been made to reduce recurrence and spread, but often cause side effects. To minimize side effects, effective alternative therapy is needed to treat and treat cancer through the use of natural ingredients, one of which is kelakai (*Stenochlaena palustris*). This study aims to test the cytotoxic activity of the ethanol extract of kelakai (*Stenochlaena palustris*) against vero cells to identify its potential as an anticancer. Extraction with 96% ethanol using the maceration method. Identification of chemical constituents was carried out qualitatively by identifying tannins, alkaloids, flavonoids, saponins, and steroids/terpenoids. Toxicity test using the MTT assay method with serial concentrations of 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.5; and 15.625  $\mu\text{g/ml}$ . The ethanol extract of kelakai contains tannins, flavonoids, steroids, alkaloids, and saponins. The test results on Vero cells obtained an IC50 value of the ethanol extract of Lakalai of 1724.5752  $\mu\text{g/ml}$ .*

**Keywords:** kelakai, toxicity, MTT, vero cells

### Abstrak

Angka kejadian dan kematian akibat kanker terus meningkat pada berbagai negara, termasuk Indonesia. Berbagai upaya melalui terapi-terapi telah

#### Artikel Info

Dikirim. : 21 April 2022

Revisi : 28 Mei 2022

Diterbitkan: 20 Juni 2022

dilakukan untuk dapat mengurangi kekambuhan dan penyebarannya, namun seringkali menimbulkan efek samping. Untuk meminimalisir timbulnya efek samping, diperlukan suatu terapi alternatif yang efektif untuk pengobatan dan mengatasi penyakit kanker melalui pemanfaatan bahan alam, salah satunya adalah kelakai (*Stenochlaena palustris*). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol kelakai (*Stenochlaena palustris*) terhadap sel vero sehingga dapat mengidentifikasi potensinya sebagai antikanker. Ekstraksi dengan etanol 96% menggunakan metode maserasi. Identifikasi kandungan kimia dilakukan secara kualitatif dengan mengidentifikasi senyawa tannin, alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid/terpenoid. Uji toksisitas dengan metode MTT assay dengan serial konsentrasi yaitu 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; dan 15,625 µg/ml. Ekstrak etanol kelakai mengandung senyawa tannin, flavonoid, steroid, alkaloid, dan saponin. Hasil uji terhadap sel vero diperoleh nilai IC50 ekstrak etanol kelakai sebesar 1724,5752 µg/mL.

**Kata Kunci:** kelakai, toksisitas, MTT, sel vero

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan tubuh. Sel tersebut tumbuh dan berkembang secara cepat dan tidak terkendali, menekan jaringan tubuh, bahkan sampai mempengaruhi organ tubuh (WHO, 2023). Angka kejadian dan kematian akibat kanker terus meningkat pada berbagai negara, termasuk Indonesia. Tahun 2020 dilaporkan sebanyak 19,3 juta kasus kanker baru, dan hampir

10 juta diantaranya berakhir dengan kematian (Sung et al., 2021).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk dapat mengurangi kekambuhan dan penyebarannya di dalam tubuh. Upaya tersebut antara lain melalui operasi, mastektomi, kemoterapi, terapi hormonal, terapi radiasi, dan/atau imunoterapi (ACS, 2021; Nugraha et al., 2019). Namun terapi-terapi ini seringkali menimbulkan efek samping. Efek samping yang ditimbulkan antara lain Mielotoksitas yang berefek menyebabkan netropenia, trombositopenia dan anemia, efek toksik terhadap sumsum tulang dan ginjal, serta

demam neutropenia (Febriani & Rahmawati, 2019). Untuk meminimalisir timbulnya efek samping, diperlukan suatu terapi alternatif yang efektif untuk pengobatan dan mengatasi penyakit kanker. Hal tersebut dapat dilakukan melalui pemanfaatan bahan alam yang mengandung berbagai senyawa yang telah dilaporkan memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas sel kanker. Salah satu yang mudah ditemui adalah kelakai (*Stenochlaena palustris*).

Masyarakat di Kalimantan Tengah banyak memanfaatkan kelakai dalam pengobatan berbagai penyakit, yaitu anemia, demam, dan sakit kulit, dan efektif juga untuk pengobatan antiinflamasi (Margono et al., 2016b, 2016a). Kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan kelakai antara lain mengandung senyawa flavonoid, fenol, alkaloid, dan steroid (Indrayanti et al., 2016; Negara et al., 2017). Kandungan zat gizi dalam kelakai antara lain protein (2,36 %), serat kasar (4,44 %), lemak (0,11 %), air (89,09 %), vitamin dan kalsium (Indrayanti et al., 2016; Purwandari, 2013). Qamariah et al. (2018) melaporkan bahwa kandungan kimia pada simplisia dan ekstrak etanol akar Kelakai yaitu alkaloid, saponin dan tanin. Alkaloid, saponin dan tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologi yang berpotensi dikembangkan sebagai antibiotik. Hasil uji sitotoksitas pada sel MCF-7 menunjukkan nilai IC50 sebesar 493,57 µg/ml (Mashar & Annah, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan

uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol kelakai (*Stenochlaena palustris*) terhadap sel vero.

## METODE

### Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu seperangkat alat maserasi, Biosafety Cabinet (BSC) (Thermo Fisher Scientific, America), Centrifuge (Sorvall, USA), CO-2 inkubator (Heraeus, Germany), Mikroskop inverted (Olympus, Germany), Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, America), dan mikropipet (Socorex, Switzerland).

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu sentrifuge tube 15 ml dan 10 ml (Huida, China), T-flask 25 cm<sup>2</sup> (FuDau Biotechnology, China), 96 well plate (Sigma-Aldrich, Germany), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Gibco, South America), Antibiotik Penicilin-streptomycin (Pen-Strep) (Sigma-Aldrich, Germany), Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, South America), medium DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Gibco, South America), Trypsin EDTA 0,05% (Gibco, South America), Trypan blue (Gibco, South America), MTT assay kit (Thermo Fisher Scientific, America), dan etanol 96% (Pro Analyse, Merck, Germany).

## Prosedur Penelitian

### 1. Pengolahan Sampel

Tumbuhan kelakai diperoleh dari Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah. Kelakai dicuci bersih kemudian dikeringkan, setelah itu disebukkan. Serbuk kelakai diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Maserasi dilakukan dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:4 selama 3x24 jam. Hasil maserasi diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (Mashar & Annah, 2020).

## **2. Identifikasi Kandungan Kimia**

### **Identifikasi Tanin**

Ekstrak uji ditambahkan pelarut FeCl<sub>3</sub>. Jika hasil menunjukkan endapan biru-hitam maka positif mengandung galotanin dan ellagotann, sedangkan jika menunjukkan endapan hitam kehijauan maka positif mengandung tannin terkondensasi (Desinta, 2015).

### **Identifikasi Alkaloid**

Sebanyak 2 ml ekstrak uji diuapkan hingga diperoleh residu. Selanjutnya residu dilarutkan dengan 5 ml HCl 2 N dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung reaksi 1 ditambahkan HCl 2 N (blanko), tabung reaksi 2 ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, dan tabung reaksi 3 ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan jingga pada tabung 2 dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung 3 (Dewi, 2013).

### **Identifikasi Flavonoid**

Sebanyak 2 ml ekstrak uji dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan dengan 0,1 g logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif

mengandung flavonoid jika terbentuk warna kuning jingga hingga merah (Ergina, 2014).

### **Identifikasi Saponin**

Ekstrak uji dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 ml air panas. Campuran tersebut didinginkan, lalu dikocok dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif jika terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit, dan ketika ditambahkan HCl 2 N buih tersebut tidak hilang (Dewi, 2013).

### **Identifikasi Steroid/Terpenoid**

Ekstrak uji sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Jika terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid, dan jika terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina, 2014).

## **3. Uji Toksisitas Dengan Metode MTT Assay**

Uji toksisitas dilakukan sesuai dengan prosedur yang ditetapkan di laboratorium kultur sel dan sitogenika, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran.

### **Preparasi media dan sampel**

- a. Disiapkan media kultur DMEM komplet (mengandung FBS 10% dan 1% Antibiotik Penicilin-streptomycin).
- b. Sampel berupa ekstrak etanol kelakai yang diencerkan dengan serial konsentrasi yaitu 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; dan 15,625 µg/ml, dengan control positif menggunakan doxorubicin 0,5; 1; dan 5 µg/ml.

### **Preparasi Sel**

- a. Sel yang akan digunakan telah konfluen min 80%.
- b. Dibuang media dalam flask, lalu bilas sel sebanyak 2x dengan 10 mL PBS.
- c. Ditambahkan 3 mL larutan trypsin-EDTA lalu diinkubasi selama 5 menit agar lapisan sel terdispersi (dibawah mikroskop inverted sel akan terlihat melayang).
- d. Dipindahkan sel ke dalam tabung sentrifuge yang telah berisi medium komplit.
- e. Disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit.
- f. Supernatan dibuang, pellet sel dilarutkan kembali dengan medium komplit baru.
- e. Diinkubasikan dengan 100 µl dari 0,5 mg/ml MTT selama 2-4 jam dalam inkubator 37oC dan CO2 5% sampai terbentuk kristal formazan.
- f. Setelah terbentuk formazan, buang larutan kit lalu ditambahkan DMSO sebagai reagen stopper.
- g. Selanjutnya diukur absorbansi pada alat elisa reader Multiskan EX dengan panjang gelombang 550 nm.

**Uji Toksisitas Terhadap Ekstrak**

- a. Seeding kultur sel ke dalam 96 well plate, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 32oC dan CO2 5%.
- b. Setelah 24 jam, masing-masing well plate ditambahkan sesuai dengan masing-masing serial konsentrasi. Dilakukan triplicate untuk masing-masing konsentrasi
- c. Diinkubasi selama 72 jam
- d. Dibuang media yang mengandung perlakuan sampel dari masing-masing well lalu masing-masing well dibilas menggunakan PBS 1x.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap ekstrak etanol kelakai dengan metode kualitatif menggunakan pereaksi warna. Metode ini merupakan salah satu metode analisis kualitatif yang sederhana untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam sampel. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi kandungan tannin, alkaloid, flavonoid, steroid/terpenoid dan saponin terhadap sampel ekstrak kelakai. Hasil identifikasi yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi Kandungan Kimia terhadap Ekstrak Kelakai

Kandungan Kimia	Hasil	Kesimpulan
Tannin	endapan hitam kehijauan	+
Alkaloid	endapan jingga	+
Flavonoid	larutan berwarna kuning jingga	+
Steroid	larutan warna hijau	+
Saponin	terbentuk buih stabil	+

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak etanol kelakai mengandung senyawa tannin, flavonoid, steroid, alkaloid, dan saponin (Arullappan et al., 2017; Rostinawati et al., 2018; Saragih et al., 2017; Suryadini, 2019). Dari seluruh senyawa yang terdapat dalam ekstrak, flavonoid dilaporkan sebagai senyawa dengan kadar yang paling tinggi (Kusmardiyani et al., 2016; Ndanusa et al., 2020).

Selanjutnya terhadap ekstrak etanol kelakai dilakukan uji toksisitas terhadap se; vero dengan metode MTT assay. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan nilai IC50. Nilai IC50 merupakan konsentrasi yang mampu menghambat sel 50% dari populasinya (Dewi et al., 2019).

Sel vero merupakan sel yang pertama kali disetujui oleh WHO untuk pengujian antivirus dan vaksin. Sel vero diperoleh dari sel ginjal yang normal. Sel Vero merupakan continuous cell line (CCL), sehingga dapat tahan dalam jangka waktu yang lama dan memungkinkan untuk karakterisasi sel yang luas sehingga dapat disimpan sebagai bank sel. Hal ini merupakan suatu keuntungan bagi sel Vero dibandingkan dengan jenis sel lain dengan waktu penyimpanan yang terbatas (Kiesslich & Kamen, 2020; Shen et al., 2019).

Uji toksisitas dengan metode MTT dilakukan menggunakan serial konsentrasi yaitu 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; dan 15,625 µg/ml. Metode MTT assay adalah teknik yang umum digunakan untuk uji toksisitas

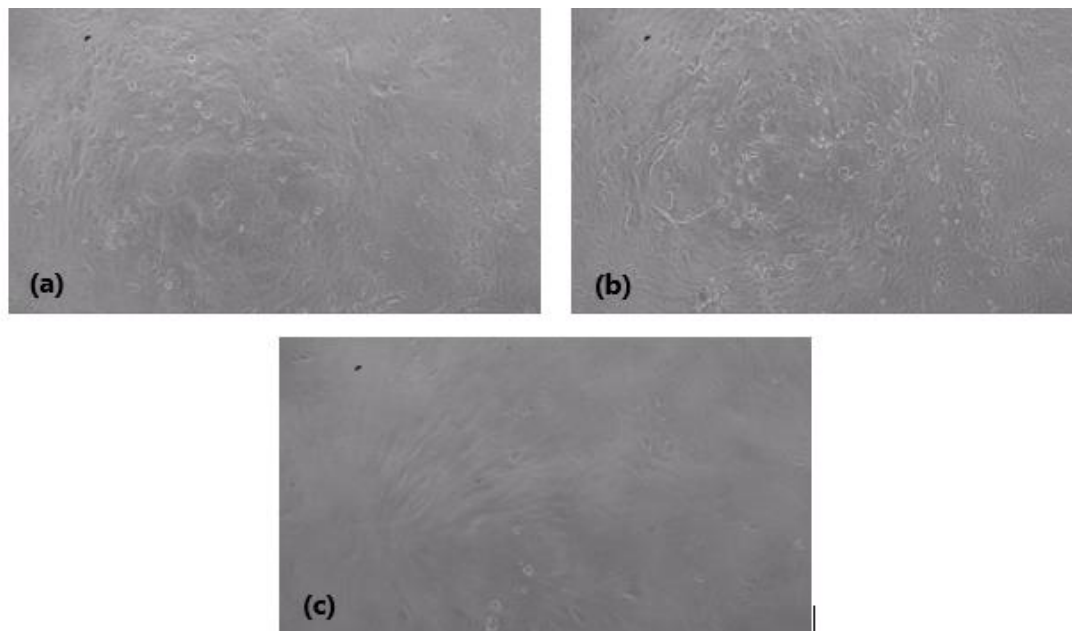
terhadap sel. Prinsip kerja MTT assay yaitu reduksi garam tetrazolium melalui dehidrogena sesuksinat mitokondria dalam sel (Houdkova et al., 2017; Stockert et al., 2012; Yang et al., 2015).

Kondisi sel vero setelah perlakuan dengan ekstrak terlihat banyak yang tidak mati atau masih dalam keadaan utuh, seperti halnya kondisi sel sebelum perlakuan dengan ekstrak (Gambar 1). Hasil uji terhadap sel vero diperoleh nilai IC50 ekstrak etanol kelakai sebesar 1724,5752 µg/mL. Nilai IC50 digunakan untuk mengetahui sifat toksik yang dapat ditimbulkan kelakai terhadap sel vero. Nilai IC50 >1000 µg/ml menunjukkan ekstrak tidak toksik (Jelita et al., 2020). Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan ekstrak etanol kelakai tidak bersifat toksik. Tingkat toksisitas tersebut menunjukkan potensi ekstrak etanol kelakai sebagai antikanker.

Potensi kelakai sebagai antikanker dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekundernya, khususnya flavonoid. Hasil penelitian Arullappan et al. (2017) menyatakan bahwa senyawa flavonoid merupakan agen terapi untuk mencegah kanker dengan cara menurunkan proliferasi sel kanker. Flavonoid terbukti dapat menghambat proliferasi sel melalui mekanisme pengaturan cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) dan cyclin B, serta tumour suppressor gene yang memainkan peran penting dalam menahan siklus sel p53 dalam sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker serviks HeLa. Ekstrak etanol kelakai

menunjukkan efek sitotoksitas terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> : 493,57 µg/ml (Mashar & Annah, 2020). Karakterisasi senyawa yang potensial sangat diperlukan untuk memperoleh

bioaktivitas yang lebih spesifik dan diperoleh hasil uji yang maksimal.



Gambar 1. Pertumbuhan Sel Vero : (a) Sebelum treatment; (b) Setelah treatment dengan ekstrak etanol kelakai; dan (c) Setelah treatment dengan doxorubicin

## KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol kelakai mengandung senyawa tannin, flavonoid, steroid, alkaloid, dan saponin.
2. Hasil uji terhadap sel vero diperoleh nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol kelakai sebesar 1724,58 µg/mL yang menunjukkan bahwa ekstrak tidak toksik. Tingkat toksisitas ini menunjukkan potensi ekstrak etanol kelakai dikembangkan sebagai antikanker.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium

Kimia Jurusan Gizi Poltekkes Kemenkes Palangka Raya; khususnya kepada Putri Ayu Lestari dan Puteri Elok Laluyangan yang telah membantu penelitian ini. Uji Sitotoksitas dilakukan di Laboratorium Kultur Sel dan Sitogenika, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran.

## DAFTAR PUSTAKA

Arullappan, S., Sawai, S., Chee, L. A., Mahandan, M., & Shanmugavelan, R. (2017). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *stenochlaena palustri*

- (Burm.f.) bedd. leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(4), S735–S740.
- Desinta, T. (2015). Penentuan Jenis Tanin Secara Kualitatif dan Penetapan Kadar Tanin dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Secara Permanganometri. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 4(1), 1–10.
- Dewi. (2013). Identifikasi kandungan kimia ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana*, 2(4), 13–18.
- Dewi, C., Ningrum, S., Saputera, D., & Arifin, R. (2019). Toxicity Test of Bay Leaf Extract on Bhk-21 Fibroblast Cells in Vitro. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*, IV(2), 178–182.
- Ergina, S. N. dan I. D. P. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air Dan Etanol. *J. Akad. Kim*, 3(3), 165–172.
- Febriani, A., & Rahmawati, Y. (2019). Efek Samping Hematologi Akibat Kemoterapi dan Tatalaksananya. *Jurnal Respirasi*, 5(1), 22.
- Houdkova, M., Rondevaldova, J., Dorskocil, I., & Kokoska, L. (2017). Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*, 118(2016), 56–62.
- Indrayanti, A. L., Hidayati, N., & Hanafi, N. (2016). Studi Kasus Analisis Pendapatan Usaha Keripik Kalakai Imur di Kota Palangka Raya. *Daun: Jurnal Ilmiah Pertanian Dan Kehutanan*, 3(1), 1–6.
- Jelita, S. F., Setyowati, G. W., Ferdinand, M., Zuhrotun, A., & Megantara, S. (2020). Uji Toksisitas Infusa *Acalypha Simensis* Dengan Metode Brine Shrip Lethality Test (BSLT). *Jurnal Farmaka*, 18(1), 14–22.
- Kiesslich, S., & Kamen, A. A. (2020). *Vero Cells*. January.
- Kusmardiyani, S., Novita, G., & Fidrianny, I. (2016). Antioxidant activities from various extracts of different parts of kelakai (*Stenochlaena palustris*) grown in central Kalimantan - Indonesia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, 215–219.
- Margono, D. P. N. H., Suhartono, E., & Arwati, H. (2016a). Pengaruh Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) Terhadap Kadar Interleukin-10 (IL-10) Mencit. 2(1).
- Margono, D. P. N. H., Suhartono, E., & Arwati, H. (2016b). Potensi Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) terhadap Kadar Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF- $\alpha$ ) pada Mencit BALB/c yang Diinfeksi Plasmodium berghei ANKA. *Berkala Kedokteran*, 12(1), 77.
- Mashar, H. M., & Annah, I. (2020). Cytotoxicity of Kelakai (*Stenochlaena palustris*) Extract to MCF-7 Breast Cancer Cell. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 7(3), 5–9.
- Ndanusa, A. H., Cicuzza, D., & Siddique, M. M.

- (2020). Analysis of the phytochemical contents and anti-oxidative properties of *Stenochlaena palustris*. *International Food Research Journal*, 27(5), 798–804.
- Negara, C. K., Murjani, & Basyid, A. (2017). Pengaruh Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris*) Terhadap Kadar Hemoglobin Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Borneo Journal of Pharmascientech*, 01(01), 10–17.
- Nugraha, A. T., Purnama, A., Komariah, S. N., & Hady Anshori, T. (2019). Cytotoxic activity of *Eriocaulon cinereum* R.BR to MCF-7 and vero cell line. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(Special Issue 5), 94–96. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s5.T0073>
- Organization, W. H. (2023). *Global Breast Cancer Initiative Implementation Framework Assessing , strengthening and scaling up services for the early detection and management of breast cancer*.
- Purwandari, S. E. (2013). Kalakai Sebagai Sayuran Organik Kalimantan Tengah. *Buletin Inovasi Teknologi Pertanian*, 1(1), 46–48.
- Qamariah, N., Handayani, R., & Novaryatiin, S. (2018). Kajian Empiris dan Etnofarmakologi Tumbuhan Hutan Berkhasiat Obat asal Desa Tumbang Rungan Kelurahan Pahandut Kota Palangkaraya Kalimantan Tengah. *Anterior Jurnal*, 18(1), 98–106.
- Rostinawati, T., Suryana, S., Fajrin, M., & Nugrahani, H. (2018). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) Terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar CLSI M02-A11. *Pharmauho : Majalah Farmasi, Sains, Dan Kesehatan*, 3(1), 1–5.
- Saragih, B., Prakoso, H. T., Rahmadi, A., Emmawati, A., & Kurniadinata, O. F. (2017). Phytochemicals , Quality and Glycemic Response Fern Red Herbal (*Stenochlaena palustris*). *Asian Academic Society International Conference (AASIC): Past, Present, and Future Asia, July*, 4–10.
- Shen, C. F., Guilbault, C., Li, X., Elahi, S. M., Ansorge, S., Kamen, A., & Gilbert, R. (2019). Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*, 37(47), 6996–7002.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–
- Suryadini, H. (2019). Uji Parameter Standard Dan Penapisan Fitokimia Pada Daun Steril Kalakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.)

Menggunakan Ekstraksi Bertingkat. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 2(1), 40–51.

Yang, Y., Lu, Y., Wu, Q. Y., Hu, H. Y., Chen, Y. H., & Liu, W. L. (2015). Evidence of ATP assay as an appropriate alternative of MTT assay for cytotoxicity of secondary effluents from WWTPs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 490–496.