SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK ETIL ASETAT TUMBUHAN PAKU Christella arida DAN UJI PENDAHULUAN SEBAGAI ANTIKANKER

SECONDARY METABOLISM COMPOUND FROM ETHYL ACETATE EXTRACT OF THE Christella arida FERN AND PRELIMINARY TEST AS ANTICANCER

Fitria Aprelia* dan Suyatno

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: fitria.aprelia@yahoo.com

Abstrak. Penelitian ini ditujukan untuk menentukan struktur molekul senyawa metabolit sekunder dari daun tumbuhan paku Christella arida dan menguji aktivitas pendahuuannya sebagai antikanker. Dalam penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi (Kromatografi Cair Vacum dan Kromatografi Lapis Tipis), dan pemurnian dilakukan dengan metode rekristalisasi. Uji kualitatif dengan pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi FeCl3, dan Shinoda Test. Penentuan struktur molekul dengan metode spektroskopi (UV-Vis, IR, dan MS). Uji pendahuluan sebagai antikanker menggunakan metode BSLT. Dari hasil penelitian diperoleh suatu isolat berupa serbuk tak berwarna dari ekstrak etil asetat dengan titik leleh 131-132 °C. Uji kualitatif senyawa isolat Liebermann-Burchard menghasilkan warna hijau kebiruan yang menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan uji dengan pereaksi FeCl3 dan Shinoda Test menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan data spektroskopi diduga bahwa senyawa hasil isolasi adalah golongan steroid yaitu kampesterol dan β -sitosterol. Berdasarkan hasil BSLT menggunakan larva udang Artemia salina L. menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dan isolat berpotensi sebagai antikanker dengan nilai LC_{50} sebesar 13,301 µg/mL dan 27,837 µg/mL.

Kata-kata kunci: Christella arida, steroid, kampesterol, β -sitosterol, ekstrak etil asetat.

Abstract. The aims of this research is to determine the molecule structure of secondary metabolism compound from the leaf of Christella arida fern and preliminary test as anticancer. In this research, extraction was carried out by maceration method, the separation by chromatography (Vacuum Liquid Chromatography and Thin Layer Chromatography), and purification by recrystalization method. Qualitative test was done by Liebermann-Burchard reagent, FeCl₃, and Shnoda Test. Determination of molecular structure by spectroscopic methods (UV-Vis, IR, and MS). Preliminary test of anticancer activity using BSLT method. Based on this research, it was obtained as colourless powder isolates from ethyl acetate with melting point of 131-132 °C. Qualitative test using Liebermann-Burchard reagent showed bluish green colour indicating the presence of steroid compound, FeCl₃ and Shinoda Test showed negative result. Based on result of spectroscopic analyze, it can be concluded that the isolate is campesterol and β -Sitosterol. Based on BSLT method using Artemia salina L. showed that ethyl acetate extract and isolate have a potency as anticancer with LC₅₀ 13,301 µg/mL and 27,837 µg/mL respectively.

Keyword: Christella arida, steroid, kampesterol, β -sitosterol, ethyl acetate extract.

PENDAHULUAN

Penyakit kanker termasuk penyakit yang sangat ditakuti karena sulit disembuhkan dan merupakan penyebab kematian ke dua setelah penyakit kardiovaskuler di negara maju [1]. Di Indonesia, angka kematian akibat penyakit kanker terus meningkat yaitu 1,4% pada tahun 1972 menjadi 4,3% pada tahun 1986 dan menjadi 4,4% pada tahun 1996 [2]. Kematian akibat kanker di seluruh

dunia diprediksi akan terus meningkat, dengan perkiraan 12 juta kematian pada tahun 2030 [3].

Pengobatan kanker yang dilakukan dengan pembedahan, radiasi, dan kemoterapi ternyata menimbulkan efek samping merugikan. Oleh karena itu, akhir-akhir ini masyarakat cenderung memanfaatkan obat herbal untuk penyembuhan berbagai penyakit, termasuk penyakit kanker. Pengobatan herbal merupakan suatu pengobatan menggunakan berbagai macam ekstrak dari tumbuhan (tanaman obat), yang dikombinasikan

dengan bahan alami lainnya yang diolah secara modern sehingga dapat membantu membersihkan saluran darah dari penyumbatan dan menstimulasi sistem kekebalan tubuh untuk bersama-sama membunuh sel kanker [4].

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kekayaan alam hayati yang beranekaragam jenisnya (megabiodiversity). Pteridophyta (tumbuhan paku) merupakan salah satu divisi tumbuhan yang menjadi kekayaan alam hayati Indonesia dan memiliki jumlah spesies yang besar. Diperkirakan sebanyak 1.300 spesies tumbuhan paku tumbuh di kawasan Indonesia [5]. Berbagai jenis spesies tumbuhan paku telah dikenal dan dimanfaatkan oleh masyarakat indonesia sebagai tanaman hias, bahan obat tradisional, bahan makanan, tanaman pelindung, dan pupuk hijau [6].

Berdasarkan hasil penelitian fitokimia yang telah dilakukan pada beberapa spesies tumbuhan paku dapat dinyatakan bahwa tumbuhan paku mengandung berbagai senyawa bioaktif golongan terpenoid, steroid, fenilpropanoid, poliketida, flavonoid, alkaloid, stilben, santon, turunan asam benzoat, lipid, dan senyawaan belerang. Sementara itu berdasarkan hasil uji bioaktivitas, beberapa metabolit sekunder dari tumbuhan paku menunjukkan aktivitas biologis yang menarik antara lain sebagai antikanker [7].

Tumbuhan paku Christella arida merupakan salah satu spesies tumbuhan paku yang jumlahnya melimpah di Indonesia. Selama ini tumbuhan tersebut dimanfaatkan sebagai tanaman tentang Penelitian kandungan kimia bioaktivitasnya dari tumbuhan tersebut belum pernah dilaporkan. Namun demikian berdasarkan kemotaksonomi, dari tumbuhan paku Christella arida kemungkinan dapat ditemukan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid, steroid, lipid, dan flavonoid karena tumbuhan tersebut termasuk family Thelypteridaceae. Beberapa senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan paku famili Thelypteridaceae menunjukkan aktivitas antikanker. Sebagai contoh senyawa flavonoid kaemferol dan matteucinol-7-O-β-D-glukosida dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku Chingia sakayensis menunjukkan aktivitas sitotoksik in vitro terhadap sel murine leukemia P-388 [8].

Mengingat masih sedikitnya informasi tentang kandungan senyawa kimia dan bioaktivitasnya dari tumbuhan paku *Christella arida* maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Christella arida* dan menguji aktivitasnya sebagai antikanker.

METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif karena ditujukan untuk mendeskripsikan struktur molekul senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Christella arida* serta menjelaskan aktivitas pendahuluannya sebagai antikanker.

Sasaran dalam penelitian ini adalah senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Christella arida* dan aktivitas pendahuluannya sebagai antikanker. Sampel tumbuhan tersebut diperoleh dari Kelurahan Kebraon, Kec. Wiyung, Kota Surabaya

Ala

Seperangkat ekstraksi dengan alat maserasi, seperangkat alat penyaring Buchner, rotary vacuum evaporator, seperangkat kromatografi lapis tipis, seperangkat kromatografi cair vakum, seperangkat kromatografi kilat, Fisher John melting point apparatus, spektrofotometer UV Shimadzu Pharma Spec.UV-1700, spektrofotometer IR Buck 500 scientific, spektrofotometer massa Shimadzu QP-2010S, spektrofotometer ¹H-NMR dan ¹³C-NMR (JEOL JNM - AL 400 FT NMR) dan alat gelas yang lazim digunakan dalam laboratorium kimia organik.

Bahan

Sampel berupa bagian daun tumbuhan paku *Christella arida, n*-heksana teknis dan p.a, etil asetat teknis dan p.a, kloroform p.a, metanol p.a, aseton p.a, asam sulfat pekat p.a, anhidrida asam asetat p.a, silika gel Merck G-60 (60-200µm), kieselgel Merck 60 GF-254, pelat KLT silika gel F-254 (20x20; 0,25 mm), larutan FeCl₃, asam klorida, pita magnesium, dan larva udang laut *Artemia salina* L.

Prosedur Penelitian

Pengumpulan dan Penyiapan Sampel Tumbuhan

Sampel yang berupa daun tumbuhan paku Christella arida diperoleh dari daerah Kelurahan Kebraon, Kec. Wiyung, Kota Surabaya dan diidentifikasi di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Selanjutnya sampel dibersihkan dari kotoran yang menempel, dikeringkan pada suhu kamar, lalu digiling sehingga diperoleh serbuk halus yang siap diekstraksi.

Ekstraksi dan Isolasi

Serbuk halus daun tumbuhan paku *Christella arida* sebanyak 1,4 kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 4 L pelarut etil asetat selama 24 jam pada suhu kamar dan diulang sebanyak 3 kali. Hasil maserasi disaring secara vakum menggunakan penyaring Buchner dan filtrat yang diperoleh diuapkan secara vakum menggunakan penguap putar (*rotary vacuum evaporator*) sehingga menghasilkan ekstrak padat.

Ekstrak padat yang diperoleh, Liebermann-Burchad, menggunakan pereaksi pereaksi FeCl₃, dan Shinoda test. Selanjutnya ekstrak tersebut dipisahkan komponenkomponennya melalui metode kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan fasa diam silika gel GF-254 dengan eluen n-heksana, campuran nheksana-etilsetat, dan etil asetat. Hasil pemisahan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat KLT silika gel F-254 dengan perbandingan eluen n-heksana-etilasetat = 4:1.

Fraksi-fraksi yang bersesuaian nilai R_f -nya dan sudah menunjukkan satu noda pada KLT digabung. Isolat dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Uji kemurnian isolat dilakukan dengan penentuan titik leleh dan KLT menggunakan tiga sistem eluen.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antikanker Senyawa Hasil Isolasi

Sebanyak 5 mg isolat dilarutkan dalam 5 mL kloroform. Larutan yang terbentuk disebut larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan induk kemudian dipipet sebanyak 10, 25, 50, 75, dan 100 µg/mL dan dimasukkan ke dalam masingmasing vial vang berbeda. Selanjutnya masingmasing vial dibiarkan sampai pelarutnya menguap, ke dalam masing-masing vial ditambah DMSO 10 μl sebagai emulgator, kemudian dimasukkan 10 ekor udang, diisi air laut sampai volumenya mencapai 5 mL dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam baru dihitung jumlah larva udang yang mati. Hasil yang diperoleh dianalisis probit dengan menggunakan program SPSS 20 for windows untuk menentukan besarnya LC50 senyawa hasil isolasi [9].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Bagian Daun Tumbuhan Paku Christella arida.

Sampel yang berupa serbuk halus dari bagian daun tumbuhan paku *Christella arida* sebanyak 1,4 kg diekstraksi dengan cara dimaserasi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksana dan etil asetat selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil maserasi dari pelarut etil asetat tersebut disaring secara vacum menggunakan corong buchner sehingga diperoleh ekstrak etil asetat dan residu. Ekstrak etil asetat yang diperoleh diuapkan secara vakum menggunakan *rotary vacuum evaporator* menghasilkan ekstrak padat berwarna hijau kehitaman sebanyak 27,550 gram.

Ekstrak pekat yang diperoleh diuji kualitatif untuk mengetahui secara awal kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut. Pada uji dengan Liebermann-Burchard menghasilkan warna hijau yang menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan pada uji dengan pereaksi FeCl₃ dan *Shinoda Test* menghasilkan tidak ada perubahan warna yang menunjukkan tidak ada senyawa fenolik dan senyawa flavonoid.

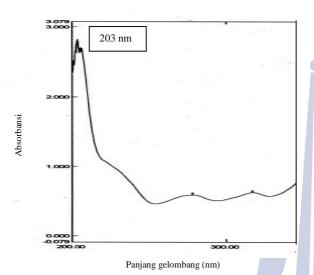
Selanjutnya ekstrak padat sebanyak 5 gram dipisahkan komponen-komponennya dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan fasa diam silica gel GF-254 dan eluen *n*-heksana, campuran *n*-heksana-etil asetat, dan etil asetat dengan perbandingan tertentu menghasilkan 127 fraksi.

Setelah dilakukan monitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT), dipilih fraksi yang menunjukkan nilai R_f yang sama pada pelat KLT yaitu fraksi 35-45 kemudian digabungkan menjadi satu. Fraksi gabungan 35-45 berbentuk padatan hijau sebanyak 647,7 mg. Selanjutnya dilakukan proses rekristalisasi dengan menggunakan pelarut methanol dan menghasilkan serbuk tak berwarna sebanyak 31,7 mg. Kemudian isolat diuji kemurnian dengan pengukuran titik leleh sebesar 131-132 °C dan kromatografi lapis tipis (KLT) tiga sistem eluen dengan perbandingan n-heksana : etil asetat 3% (97 : 3); *n*-heksana : etil asetat 5% (95 : 5); dan kloroform. Hasil pengujian dengan KLT tersebut menunjukkan hasil berupa satu noda dengan R_f masing-masing 0,48; 0,65; 0,94.

Isolat yang diperoleh juga diuji kualitatif kembali dengan Liebermann-Burchard menghasilkan warna hijau kebiruan yang menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan pada uji dengan pereaksi FeCl₃ dan *Shinoda Test* menunjukkan hasil negatif yang menunjukkan tidak ada senyawa fenolik dan senyawa flavonoid.

Penentuan Struktur Isolat

Hasil pengukuran spectra ultraviolet (UV) senyawa hasil isolasi menunjukkan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm seperti yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum UV-Vis Isolat

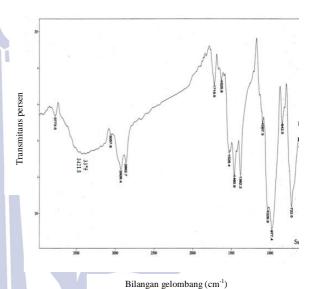
Berdasarkan hasil pengukuran spectrum UV-Vis dengan munculnya puncak pada λ_{mak} 203 nm menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi akibat adanya transisi electron $\pi \rightarrow \pi^*$.

Pada spektrum IR terdapat adanya gugus fungsi -OH ditunjukkan pada daerah absorpsi 3375 dan 3421,8 cm⁻¹, vibrasi ulur -CH₃ dan -CH₂ pada daerah 2926,4 dan 2862,7 cm⁻¹, C=C pada daerah 1625,8 cm⁻¹, C-H pada daerah 1460,9 dan 1382,2 cm⁻¹, dan C-O pada daerah 1097,3 dan 1029,9 cm⁻¹. Adanya regang C-H alkil (2926,4 dan 2862.7 cm⁻¹), regang C=C (1625,8 cm⁻¹), dan vibrasi tekuk C-H (1460,9 dan 1382,2 cm⁻¹) yang mendukung adanya kerangka senyawa steroid dalam isolat. Adanya puncak pada regang 3375 dan 3421,8 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur O-H dan adanya vibrasi C-O pada puncak 1097,3 dan 1029,9 cm⁻¹ mendukung isolat tersebut menujukkan senyawa steroid jenis sterol yang memiliki gugus hidroksil. Hasil pengukuran spectrum IR seperti yang disajikan pada Gambar 2.

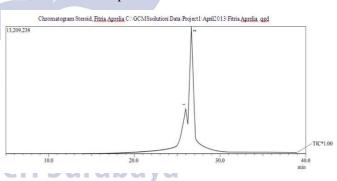
Setelah dilakukan uji spektrofotometri IR isolat, dilakukan uji spektrometri MS untuk

menentukan struktur dan massa molekul senyawa tersebut. Hasil kromatogram GC isolat dapat dilihat pada Gambar 3 dan untuk spectrum MS disajikan pada Gambar 4.

Berdasarkan hasil kromatgram GC terdapat dua puncak utama yang memiliki waktu retensi berturut-turut 25,965 dan 26,604 menit dengan persen area berturut-turut 25,05% dan 74,95%. Spektrum massa dari senyawa yang terdapat dalam tiga puncak tersebut masing-masing menunjukkan massa molekul relatif sebesar 400 dan 414.

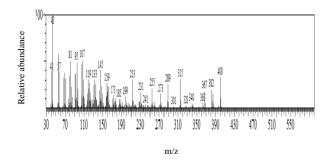


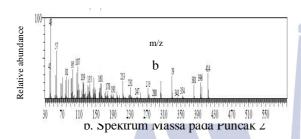
Gambar 2. Spektrum IR Isolat



Gambar 3. Kromatogram GC Isolat

Senyawa dengan massa molekul relatif sebesar 400 dengan puncak ion molekul m/z, yaitu : 400 (M⁺), 382, 367, 363, 340, 328, 315, 301, 289, 273, 255, 241, 231, 213, 199, 185, 173, 159, 145, 133, 119, 107, 95, 81, 57, 43, dan 41. Sementara itu, pada massa molekul relatif sebesar 414 ditunjukkan dengan puncak-puncak ion molekul pada m/z, yaitu : 414 (M⁺), 396, 381, 354, 341, 329, 303, 288, 273, 247, 231, 213, 191, 178, 161, 135, 119, 107, 95, 81, 57, 43, dan 41.





a

Spektrum massa senyawa hasil isolasi menunjukkan terdapatnya tiga senyawa utama golongan steroid dengan massa molekul relatif berturut-turut sebesar 400, 412, dan 414. Pola fragmentasi yang ditunjukkan dalam spectrum massa mendukung bahwa isolat yang dihasilkan merupakan golongan senyawa steroid yaitu kampesterol (C₂₈H₄₈O), stigmasterol (C₂₉H₄₈O) dan β-sitosterol (C₂₉H₅₀O). Struktur senyawa hasil isolasi tersebut didukung dengan data spektrum UV-Vis dan IR.

Adanya kandungan senyawa metabolit sekunder golongan steroid jenis kampesterol dan β-sitosterol ekstrak etil asetat pada tumbuhan paku Christella arida mendukung penelitian sebelumnya bahwa dalam tumbuhan paku famili Thelypterdaceae terdapat senyawa steroid jenis βsitosterol [7].

Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) pada Ekstrak Etil Asetat dan Senyawa Hasil Isolasi

Hasil uji pendahuluan aktivitas antikanker dengan metode BSLT pada ekstrak etil asetat dan senyawa hasil isolasi ditunjukkan dengan data ratarata persentase kematian udang Artemia salina L Tabel 1 dan 2. Rata-rata persentase kematian udang Artemia salina L. yang diperoleh dianalisis probit menggunakan SPSS.

Tabel 1. Kematian Udang Artemia salina L. pada Ekstrak Etil Asetat

No	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Udang				%	Kemat	Rata-rata % Kematian	
			1	2	3	1	2	3	Kemanan
1	10	10	7	7	8	70	70	80	73,3
2	25	10	8	8	7	80	80	70	76,7
3	50	10	8	9	9	80	90	90	86,7
4	75	10	9	9	9	90	90	90	90
5	100	10	9	9	10	90	90	100	93,3

Tabel 2. Kematian Udang Artemia salina L. pada **Isolat**

		No Konsentrasi (ppm)		Jumlah Kematian Udang			% Kematian			Rata-rata % Kematian
				1	2	3	1	2	3	Kemanan
	1	10	10	6	6	6	60	60	60	60
	2	25	10	6	7	7	60	70	70	66,7
Mnivorcitae No.	3	50	10	7	8	6	70	80	60	70
minner 21192 MG	4	75	10	7	7	8	70	70	80	73,3
Kampesterol	5	100	10	8	7	8	80	70	80	76,7

β- sitosterol

Gambar 5. Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Hasil uji baik ekstrak etil asetat maupun senyawa isolat menunjukkan hasil positif terhadap aktivitas antikanker. Dari analisis menggunakan program SPSS 20 for windows diperoleh harga LC50 pada ekstrak etil asetat sebesar13,301 µg/mL sedangkan harga LC₅₀ pada senyawa isolat sebesar 27,837 µg/mL.

Dari hasil pengujian dengan uji BSLT yang disajikan, maka baik ekstrak etil asetat maupun senyawa hasil isolasi dapat digolongkan sebagai zat toksik. Dengan demikian senyawa tersebut mempunyai peluang untuk digolongkan senyawa yang bersifat antikanker. Menurut Anderson (1991), bahwa senyawa murni dianggap memiliki aktivitas biologis apabila nilai $LC_{50} < 200~\mu g/mL$ dan ekstrak dianggap memiliki aktivitas biologis apabila nilai $LC_{50} < 1000~\mu g/mL$ [10].

Menurut Meyer, *et al.* (1982) tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat harga LC_{50} -nya. Suatu ekstrak dianggap sangat toksik bila memiliki nilai LC_{50} di bawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC_{50} 30-1000 ppm, dan dianggap tidak toksik bila nilai LC_{50} di atas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut memberi makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor. Semakin kecil harga LC_{50} semakin toksik suatu senyawa dan semakin berpotensi sebagai senyawa antitumor [11].

Namun demikian untuk lebih memastikan berapa besar aktivitas antikanker dari ekstrak etil asetat maupun senyawa isolat perlu dilakukan uji langsung pada sel kanker.

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan hasil pembahasan terhadap hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa :

- Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada isolat yang dari bagian daun tumbuhan paku *Christella arida* diduga merupakan senyawa steroid yaitu kampesterol dan βsitosterol.
- 2. Uji aktivitas antikanker pada ekstrak etil asetat dan isolat dari daun tumbuhan paku Christella arida menunjukkan hasil yang positif memiliki aktivitas sebagai antikanker pada uji pendahuluan dengan metode **BSLT** menggunakan larva Artemia salina L. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai L_{C50} pada ekstrak etil asetat sebesar 13,301 µg/mL. Sedangkan nilai L_{C50} pada isolat sebesar 27,837 µg/mL. Dengan demikian baik ekstrak maupun senyawa hasil isolasi yang tergolong senyawa steroid memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan aktif antikanker.

Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan melakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kekuatan aktivitas antikanker baik dari ekstrak etil asetat maupun senyawa steroid hasil isolasi dengan melakukan uji langsung pada sel kanker dan pengujian secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- 1. Sulistiya, G. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta : UI Press.
- 2. Winarno, W. 1996. *Cermin Dunia Farmasi*. No. 29. Hal. 33.
- 3. NCI. 2012. Cancer Treatment. http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment.h tml. diakses tanggal 11 April 2013.
- 4. Anonim. 2010. *Fitokimia Komponen Ajaib Cegah PJK, DM dan Kanker*. Amelia (Puslitbang Bogor). Kimia@net.mht. Diakses pada tanggal 02 Januari 2013.
- Sastrapadja, S. 1980. Jenis Paku Indonesia. Jakarta: Balai Pustaka.
- 6. Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kehutanan.
- Suyatno. 2008. Senyawa Metabolit Sekunder dari Tumbuhan Paku Chingia sakayensis (Zeiller) Holt dan Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Murine Leukimia P-388 secara in vitro. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- 8. Sutoyo, S., Indrayanto, G., Zaini, N.C. 2007. Flavonoids from the Fern *Chingia sakayensis* (Zeiller) Holtt and Evaluation of Their Cytotoxicity againts the Murine Leukemia P-388 Cells. *Natural Product Communications*. 2 (9) 917-918.
- 9. Mc Laughlin, J.L., Chang, Ching-Jer & Smith, D.L. 1991. The Unesco Regional Workshop on the Bioassay of Natural Product with Special Emphasis on Anticancer Agent. UM Malaysia.
- 10. Anderson, J.E., and Mc. Laughlin, J.L. 1991. A
 Blind Comparison of Simple Bench Top
 Bioassay and Human Tumour Cell
 Cytotoxicities as Antitumour Pre-sreens.

 Phytochemical Anal 2:107-111.
- 11. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nicholas, D.E & Mc Laughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: A Convenient General Biossay for Active Plant Constituent. Purdue University.