

Research Report

Potensi ekstrak etanol kulit batang kayu tengkawang pelepak (*shorea seminis*) terhadap apoptosis sel kanker rongga mulut pada mencit mus musculus yang diinduksi *benzo(a)pyrene*

(Potential of Ethanol Extract from Stem Bark of Shorea seminis to Increase Apoptosis Oral Cancer Cell Induced by Benzo(a)pyrene on Mus Musculus Mice)

Haninda Iffatuz Zahrah¹, Theresia Indah Budhy², Edhi Juliarso²

¹Mahasiswa Strata-1 Pendidikan Dokter Gigi

²Staf Pengajar Departemen Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background: Oral cancer is a serious problem in some countries. This cancer on the 6th grade from all of the cancer in the world. Nowadays, therapy of oral cancer are surgery and chemotherapy that has a lot of side effects. A therapy using ethanol extract from stem bark of *Shorea seminis* that is minimum side effects yet easy to be found. *Shorea seminis* containing oligostilbenoids compound, this compound can increase p53 gene expression. **Purpose:** To prove and analyze the best dose of ethanol extract from stem bark of *Shorea seminis* to increase apoptosis of oral cancer. **Methods:** This research is preliminary research and the laboratories experimental with post test only control group design. There are 26 *Mus musculus* mice as research samples, and divided into four group, namely KK (control group), KP1 (250 mg/kg BB), KP2 (500 mg/kg BB), and KP3 (750 mg/kg BB). All of this samples were injected by *benzo(a)pyrene* intra muscular in oral twice a week for a month with the dose 8 mg/kg BB. Furthermore, each group was given stem bark of *Shorea seminis* ethanol extract everyday with the dose 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, and 750 mg/kg BB for a month. All samples were sacrificed and processing to detect apoptosis by immunohistochemistry among group. The data were tabulated and analyze statistically. **Result:** The total of apoptosis in KP3 is higher than KP1 and KP2. This result prove that stem bark of *Shorea seminis* ethanol extract can increase apoptosis of oral cancer cell. The dose 750 mg/kg BB has the highest total of apoptosis compared with another dose. **Conclusion:** Stem bark of *Shorea seminis* ethanol extract can increase apoptosis of oral cancer cell, especially in dose of 750 mg/kg BB.

Keywords: *Shorea seminis*, *Benzo(a)pyrene*, apoptosis, oral cancer

ABSTRAK

Latar Belakang: Kanker rongga mulut merupakan salah satu masalah serius di beberapa negara. Kanker tersebut menduduki peringkat keenam di seluruh dunia. Saat ini, terapi kanker rongga mulut yang dilakukan adalah operasi dan kemoterapi, terapi tersebut memiliki banyak efek samping. Sebuah terapi yang menggunakan ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* memiliki efek samping yang minimal dan mudah untuk ditemukan. *Shorea seminis* mengandung senyawa oligostilbenoids, senyawa ini dapat meningkatkan ekspresi gen p53. **Tujuan:** Untuk membuktikan dan menganalisis dosis terbaik dari ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* yang dapat meningkatkan apoptosis sel kanker rongga mulut. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dan eksperimental laboratorium dengan *post test only control group design*. Ada 26 ekor mencit mus musculus yang digunakan sebagai sampel penelitian dan dibagi menjadi empat kelompok, yaitu KK (kelompok kontrol), KP1 (250 mg / kg BB), KP2 (500 mg / kg BB), dan KP3 (750 mg / kg BB) . Semua sampel ini diinjeksi dengan *benzo(a)pyrene* pada intra oral dua kali seminggu selama satu bulan dengan dosis 8 mg / kg BB. Selanjutnya, masing-masing kelompok diberi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* setiap hari dengan dosis 250 mg / kg BB, 500 mg / kg BB, dan 750 mg / kg BB selama satu bulan. Kemudian semua sampel dikorbankan dan dilakukan pengolahan untuk mendeteksi apoptosis dengan pemeriksaan imunohistokimia. Data ditabulasi dan dilakukan analisis statistik. **Hasil:** Apoptosis di KP3 lebih tinggi dari KP1 dan KP2. Hasil ini

membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dapat meningkatkan apoptosis sel kanker rongga mulut. Dosis 750 mg / kg BB memiliki jumlah apoptosis yang paling tinggi dibandingkan dengan dosis yang lain. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dapat meningkatkan apoptosis sel kanker mulut, khususnya pada dosis 750 mg / kg BB.

Kata kunci: *Shorea seminis*, *Benzo(a)pyrene*, apoptosis, kanker rongga mulut

Korespondensi (*correspondence*): Haninda Iffatuz Zahrah, Mahasiswa Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60132, Indonesia. Email : haninda@rocketmail.com

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit dengan karakteristik gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan perilaku sel yang tidak terkontrol.¹ Pada pengaturan kanker, terjadi kombinasi proliferasi sel dan apoptosis yang terganggu.² Gen p53 merupakan pengatur proliferasi yang juga berperan dalam mengontrol apoptosis.³ Menurut Reksoprawiro (2008) angka kejadian kanker rongga mulut di rumah sakit dr. Soetomo Surabaya, Indonesia dari tahun 1997-2007 adalah 184 kasus.⁴ Pengobatan yang selama ini dilakukan meliputi pembedahan, penyinaran radioterapi, dan penggunaan obat-obat kemoterapi. Namun pengobatan tersebut memiliki efek farmakologi kurang selektif dan efek samping yang merugikan.^{5,6} Sehingga diperlukan pengobatan yang lebih efektif dan mudah dijangkau masyarakat.

Kayu tengkawang pelepak (*Shorea seminis*) merupakan salah satu tanaman pohon penghasil kayu yang sangat unggul kualitasnya. *Shorea seminis* merupakan salah satu spesies dari dipterocarpaceae, *Shorea seminis* mengandung senyawa oligostilbenoid yang merupakan senyawa turunan fenol yang tersusun oleh unit-unit resveratrol.^{7,8} Senyawa oligostilbenoid dalam ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* telah diuji toksisitasnya menggunakan benur udang *Artemia salina* (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan didapatkan hasil isolasi toksik terhadap benur udang *Artemia salina* ($LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$).⁸ Uji *Brine Shrimp Lethality Test* merupakan salah satu metode umum dalam tes bioaktivitas senyawa kimia. Metode ini sering digunakan untuk screening awal sebelum uji sitotoksitas menggunakan sel kanker.^{9,10,11} Selain itu, telah

dilakukan uji sitotoksitas ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dengan menggunakan sel murine leukemia P388 untuk mengetahui potensi sebagai anti kanker dan didapatkan hasil sitotoksitas yang tinggi ($IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$).^{8,12}

Dalam sebuah penelitian senyawa oligostilbenoid yang terdapat pada kulit batang *Hopea odorata* yang merupakan salah satu genus Dipterocarpaceae menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi gen p53 yang aktif.¹³ Berdasarkan hasil penelitian, *Hopea mengarawan* yang merupakan salah satu spesies dari Dipterocarpaceae menunjukkan adanya sifat antimutagenik oleh karena dapat menurunkan jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus pada kelompok mencit yang diberi siklofosfamid diikuti pemberian ekstrak etanol *Hopea mengarawan* dengan dosis 300 dan 600 mg/ kg BB.¹⁴ Dari identifikasi spektroskopi didapatkan beberapa senyawa aktif yang sama antara *Shorea seminis*, *Hopea mengarawan* dan *Hopea odorata*. Namun belum diketahui potensi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dapat meningkatkan apoptosis sel kanker rongga mulut.

Apoptosis merupakan kematian sel jalur utama untuk menghilangkan sel atau membunuh sel yang tidak diperlukan atau menjadi ancaman bagi tubuh.¹⁵ Masalah pengaturan apoptosis telah terlibat dalam penyakit kanker, pada penyakit tersebut ditandai dengan terlalu sedikitnya proses apoptosis yang terjadi.³ Apoptosis merupakan proses bertingkat, terutama dipengaruhi oleh aktivasi dari beberapa sintein protease. Terdapat tiga produk gen yang sangat diperlukan untuk terjadinya proses apoptosis yaitu *caspase*, *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), dan famili *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2).⁴ Beberapa terapi antikanker

bergantung pada proses apoptosis, karena tumor yang menunjukkan apoptosis lebih sensitif terhadap kemoterapi akan cenderung memiliki prognosis yang baik.¹⁶ Oleh karena itu peneliti ingin meneliti kematian sel kanker karena merupakan salah satu indikator keberhasilan terapi antikanker.

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui potensi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dalam meningkatkan apoptosis sel kanker rongga mulut.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dan penelitian eksperimental laboratoris secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan *post test control group design*. Sampel yang digunakan adalah mencit mus musculus jantan berusia 3 bulan dengan berat badan 20-30 gram. Dalam penelitian ini

Kelompok	Rerata sel yang mengekspresikan Caspase 3
Kontrol	11,25
KP1 (dosis 250mg/gr BB)	31,67
KP2 (dosis 500mg/gr BB)	18,33
KP3 (dosis 750mg/gr BB)	50

digunakan mencit sebanyak 26 ekor yang dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang berbeda dimana terdapat 1 kelompok kontrol (KK) dan 3 kelompok perlakuan (KP1, KP2, dan KP3). Pada penelitian ini sel kanker didapatkan dari jaringan mukosa rongga mulut mencit yang telah diinduksi *benzo(a)pyrene*. Mencit tersebut diinjeksi *benzo(a)pyrene* dengan dosis 8 mg/kg BB. Pemberian *Benzo(a)pyrene* dilakukan pada seluruh sampel secara injeksi pada intra oral sedalam 2-3 mm pada daerah sekitar kelenjar parotis dan kelenjar liur mencit sebanyak 0,05 ml sebelah kanan setiap 2 kali seminggu selama 4 minggu.¹⁷ Untuk pengecekan sel kanker pada mencit lain dilakukan pemeriksaan klinis berupa benjolan tumor, untuk indikasi bahwa sel kanker telah tumbuh pada mencit tersebut.

Setelah pemberian injeksi selesai, yaitu setelah 4 minggu, mencit mus musculus jantan diberi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* sesuai pada kelompoknya, yaitu 250 mg/kg BB pada KP1, 500 mg/kg BB pada KP2, dan 750 mg/kg BB pada KP3. Pada penelitian selanjutnya dilakukan pengamatan apoptosis sel

kanker yang terjadi pada mencit tersebut menggunakan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal caspase-3 dengan *counterstain* hematoksilin. Setelah pembuatan preparat selesai dilakukan perhitungan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali dilakukan pada 5 lapang pandang yang berbeda. Perhitungan dilakukan pada sel yang berwarna coklat, karena sel tersebut merupakan sel yang positif mengekspresikan caspase 3.

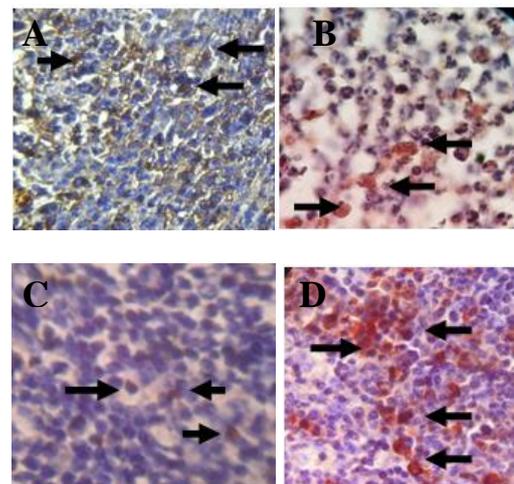
Setelah dilakukan penghitungan jumlah sel, data yang diperoleh dari hasil penelitian dikelompokkan dan dianalisis dengan menggunakan uji statistik *Oneway Analysis of Variance (ANOVA)* dan dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan efektifitas pada kelompok perlakuan.

HASIL

Dari hasil penelitian mengenai potensi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dalam meningkatkan apoptosis sel kanker rongga mulut didapatkan nilai rerata ekspresi caspase 3 sebagai berikut:

Tabel 1. Rerata ekspresi caspase-3 pada setiap kelompok

Berdasarkan hasil penelitian dapat terlihat bahwa rerata sel yang mengekspresikan caspase 3 pada kelompok perlakuan lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dan rerata sel yang mengekspresikan caspase 3 pada KP3 (750mg/kg BB) merupakan rerata yang paling banyak diantara rerata kelompok lainnya.



Gambar 1. A. Gambaran ekspresi caspase 3 pada Kelompok Kontrol yang ditunjukkan anak panah pada pembesaran 400x.
 B. Gambaran ekspresi caspase 3 pada KP1 (dosis 250 mg/kg BB) yang ditunjukkan anak panah pada pembesaran 400x.
 C. Gambaran ekspresi caspase 3 pada KP2 (dosis 500 mg/kg BB) yang ditunjukkan anak panah pada pembesaran 400x.
 D. Gambaran ekspresi caspase 3 pada KP3 (dosis 750 mg/kg BB) yang ditunjukkan anak panah pada pembesaran 400x.

Analisa data dilakukan dengan uji *Oneway ANOVA*. Hasil uji *Oneway ANOVA* adalah signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan yang signifikan anatara keempat kelompok tersebut. Selanjutnya dilakukan uji *Post-Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan efektifitas pada kelompok perlakuan. Uji *Post Hoc Test* dilakukan menggunakan *Tukey HSD* yang hasilnya dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 2. Hasil Uji *Post Hoc Test*

		KP1 (250 mg/kg BB)	KP2 (500 mg/kg BB)	KP3 (750 mg/kg BB)
Kontrol	-	0,037	0,733	0,000
KP1 (250 mg/kg BB)	0,037	-	0,169	0,036
KP2 (500 mg/kg BB)	0,733	0,169	-	0,000
KP3 (750 mg/kg BB)	0,000	0,036	0,000	-

Pada tabel 5.2 menunjukkan analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara kelompok kontrol dengan KP1 (250 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.037 < 0.05$ dan menunjukkan ada perbedaan yang signifikan. Sedangkan analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara kelompok kontrol dengan KP2 (500 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.733 > 0.05$ yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Kemudian analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara kelompok kontrol dengan KP3 (750 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.000 < 0.05$ yang menunjukkan ada perbedaan yang signifikan.

Analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara KP1 (250

mg/kg BB) dengan KP2 (500 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.169 > 0.05$ yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Sedangkan analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara KP1 (250 mg/kg BB) dengan KP3 (750 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.036 > 0.05$ yang menunjukkan ada perbedaan yang signifikan. Kemudian analisa jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 antara KP2 (500 mg/kg BB) dengan KP3 (750 mg/kg BB) didapatkan nilai p hitung sebesar $0.000 < 0.05$ yang menunjukkan ada perbedaan yang signifikan.

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* terhadap apoptosis sel kanker rongga mulut mencit mus musculus yang diinduksi *benzo(a)pyrene*. *Benzo(a)pyrene* merupakan bahan yang dapat meningkatkan oksidasi dari berbagai metabolisme dalam tubuh.¹⁸ *Shorea seminis* atau kayu tengkawang pelepak merupakan salah satu tumbuhan dari Famili Dipterocarpaceae yang mengandung senyawa oligostilbenoids. Telah dilaporkan bahwa sejumlah senyawa oligostilbenoid memiliki aktivitas biologi sebagai antitumor.¹⁹ Dalam sebuah penelitian senyawa oligostilbenoid dapat meningkatkan ekspresi gen p53 yang aktif.¹³

Pada penelitian ini sel kanker didapatkan dari jaringan mukosa rongga mulut mencit mus musculus jantan berusia 3 bulan yang telah diinduksi *benzo(a)pyrene*. Setelah didapatkan kondisi kanker, ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* diaplikasikan pada tiap kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan pengamatan apoptosis sel kanker yang terjadi pada mencit tersebut menggunakan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal caspase-3 dengan *counterstain* hematoksilin. Pada pewarnaan tersebut sel yang positif mengekspresikan caspase-3 akan berwarna coklat sedangkan sel yang negatif akan berwarna ungu. Ekspresi bentuk aktif dari caspase 3 didalam sel terjadi pada awal proses apoptosis dan menunjukkan gambaran morfologi kematian sel sehingga deteksi peningkatan ekspresi caspase 3 didalam sel melalui pemeriksaan imunohistokimia dapat

dijadikan dasar untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis.²⁰

Hasil analisa data jumlah apoptosis pada kelompok kontrol dan perlakuan (KP1, KP2 dan KP3) dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan data dengan distribusi normal dan uji *Levene test* didapatkan data yang homogen. Selanjutnya dilakukan analisa dengan uji *Oneway ANOVA* untuk membandingkan jumlah apoptosis antara kelompok kontrol, KP1, KP2, dan KP3 dan didapatkan perbedaan yang bermakna. Selanjutnya dilakukan uji *Post-hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang terdapat perbedaan bermakna yaitu antara kelompok kontrol dengan KP1 ($p = 0.037$) dan kelompok kontrol dengan KP3 ($p = 0.000$). Disisi lain, tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan KP2 ($p = 0.733$). Namun KP1, KP2, dan KP3 mempunyai rerata jumlah apoptosis yang lebih banyak dibanding kelompok kontrol.

Jumlah apoptosis pada kelompok perlakuan lebih banyak daripada kelompok kontrol. Hal ini membuktikan bahwa senyawa oligostilbenoid yang terkandung dalam *Shorea seminis* mempunyai peran dalam peningkatan jumlah apoptosis pada sel kanker rongga mulut. Hal tersebut didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa senyawa oligostilbenoid yang terkandung di dalam ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* telah diuji toksisitasnya menggunakan benur udang *Artemia salina* (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan didapatkan hasil isolasi toksik terhadap benur udang *Artemia salina* ($LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$).⁸ Uji *Brine Shrimp Lethality Test* merupakan salah satu metode umum dalam tes bioaktivitas senyawa kimia. Metode ini sering digunakan untuk screening awal sebelum uji sitotoksitas menggunakan sel kanker.^{9,10,11} Selain itu, telah dilakukan uji sitotoksitas ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dengan menggunakan sel murine leukemia P388 untuk mengetahui potensi sebagai anti kanker dan didapatkan hasil sitoksitas yang tinggi ($IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$).^{8,12}

Dalam sebuah penelitian senyawa oligostilbenoid dapat meningkatkan ekspresi gen *p53* yang aktif.¹³ Dengan teraktivasinya protein *p53* maka akan memicu peningkatan regulasi *Bax* (pro apoptosis) dan penghambatan regulasi *Bcl-2* (antiapoptosis) pada membran mitokondria. Hal tersebut akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran dari mitokondria. Sehingga mitokondria akan

terinduksi untuk membuka *Pt-pore* dan melepas sitokrom-c ke *sitosol*. Di *sitosol* sitokrom-c akan mengaktivasi *Apaf-1*, yang selanjutnya *Apaf-1* akan mengaktivasi kaskade-kaspase.²¹ Kaspase yang aktif akan mengaktifkan DNAse, menembus membran inti dan merusak DNA yang mutasi. Sehingga DNA sel yang mutasi mengalami fragmentasi dan akhirnya mengalami kematian sel (apoptosis).

Berdasarkan uji statistika didapatkan perbedaan yang signifikan antara KP1 dengan KP3 ($p=0.036$). Hal tersebut membuktikan bahwa KP3 (dosis 750 mg/kg BB) merupakan dosis yang paling berpengaruh terhadap peningkatan apoptosis. Sedangkan KP2 menurun jika dibandingkan dengan KP1, hal tersebut disebabkan karena pada KP2 didapatkan beberapa sampel yang telah mengalami *undifferentiated*. Kemungkinan pada KP2 hewan coba mengalami stres psikis, sesuai dengan laporan Reiche *et al* (2004) yang mengatakan bahwa stres psikis dapat memicu dan memperparah kanker.²² Sehingga pada KP2 banyak sampel yang telah mengalami kanker *undifferentiated*. Disisi lain, keadaan tersebut dipengaruhi oleh sistem imun. Seperti diketahui sistem imun merupakan salah satu faktor predisposisi kejadian suatu kanker. Bila sistem imun menurun maka progresivitas kanker menjadi cepat. Mengingat hal tersebut, pada penelitian ini kanker terjadi pada sel kelenjar limfe dimana banyak didapatkan sel imun kompeten, maka kemungkinan telah terjadi penurunan sistem imun.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit batang *Shorea seminis* dapat meningkatkan jumlah apoptosis sel kanker rongga mulut. Dosis 750 mg/kg BB merupakan dosis yang paling berpengaruh terhadap peningkatan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Warshawsky, David., Landolph, Joseph R. 2006. *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*. Taylor & Francis Group; CRC Press. Pp 6.
2. Dash Phil. 2007. *Apoptosis*. Basic Medical Sciences, ST. George's University of London: London Pp 1-4.
3. Brandt, L.S., Molly, K.M. 2004. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25(11); 2033-2044.

4. Reksoprawiro, S. 2008. Surgery in Locally Advanced Oral Cancer. Presented in: *Asian Association of Oral and Maxillofacial Surgeon*. Proceeding 2008; Bali, Indonesia.
5. Rizali, E dan Auerkari E.I. 2003. Teknik pewarnaan silver (AgNOR) sebagai salah satu cara menentukan aktivitas proliferasi sel tumor dan apoptosis. *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia* 10 (3); Hal 41-45.
6. Sismindari. 2005. *Target biologi sebagai tantangan pada penemuan dan pengembangan obat antikanker*. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Hal 1-5.
7. Hakim, E.H. 2002. Oligostilbenoid dari tumbuh-tumbuhan Dipterocarpaceae. *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.*, 2, Hal 1-9.
8. Aminah, Nanik Siti. 2003. *Fitokimia beberapa spesies shorea (dipterocarpaceae) Hutan tropika kalimantan*. Disertasi. Bandung; Institut Teknologi Bandung.
9. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nicols, D. E., and McLaughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp : A Comvenient general Bioassay For Active Plant Constituents. *Plant Medica*. Pp 31-34.
10. Nurhayati. A.P.D., N. Abdulgani, R.Febrianto. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimia Indonesia*. 2(1) : 41-46.
11. Bawa, G. 2009. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Toksik dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L.). *Jurnal Kimia*. 3 (2):117-124.
12. Maulidiyah. 2011. *Isolasi dan Penentuan Struktur serta Uji Bioaktivitas Senyawa Kimia dari Ekstrak Aseton Linchen Usnea blepharea Motyka dan Usnea flexuosa Tayl.* Disertasi. Jakarta; Universitas Indonesia. Hal 17.
13. Aznam, Nurfina., Atun, Sri., Arianingrum, Retno. 2011. Pengembangan produk ekstrak bahan aktif yang mengandung senyawa oligoresveratrol dari tumbuhan meranti sebagai obat kanker. Paten. Yogyakarta: *Lembaga Penelitian Universitas Negeri Yogyakarta*.
14. Atun, Sri., Aznam, Nurfina., Arianingrum, Retno., Utami, Barokah Sri., Sholeh, Aries Badrus. 2009. Bahan aktif antimutagenik dari tumbuhan *hopea mengarawan* (Dipterocarpaceae). Paten. Yogyakarta: *Lembaga Penelitian Universitas Negeri Yogyakarta*.
15. Rode, H. 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation* 4th ed. Mannheim: Roche Diagnostic GmbH. Pp 2-10.
16. Jain, A., Maheswari, V., Alam, K., Mehdi, G., Sharma, S.C. 2009. Apoptosis in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity : A light microscopic study. *Indian J Pathol Microbiol*. Pp 52.
17. Budhy, T. I. 2000. *Mekanisme Nekrosis Sel Kanker Oleh Sel Imunokompeten Makrofag Karena Pemberian Ekstrak Teh Hitam Pada Mukosa Rongga Mulut yang Terpapar Benzopirene*. Surabaya: Universitas Airlangga.
18. Uno S, Dragin N, and Miller ML. 2007. Basal and Inducible CYP1 mRNA Quantitation and Protein Localization through out the Mouse Gastrointestinal Tract. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 44, No. 4. Pp 570-83.
19. Tanaka, T., T. Ito, K. Nakaya, M. Iinuma. S. Riswan. 2000-c. Oligostilbenoids in stem bark of *Vatica rassak*, *Phytochemistry*, 54, 63-69.
20. Tanaka, T., T. Ito, Y. Ido, K. Nakaya, M. Iinuma, Y. Takashashi, H. Naganawa, S. Riswan. 2000-a. Six new heterocyclic stilbene oligomers from stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Heterocycles*, 55,729-740.
21. Tanaka, T., T. Ito, Y. Ido, T. K. Son, K. Nakaya, M. Iinuma, M. Ohyama, V. Chelladurai. 2000-d. Stilbenoids in stem bark of *Hopea parviflora*, *Phytochemistry*, 53, 1009-1014.
22. Pizem J., Cor A. 2003. Survivin - an inhibitor of apoptosis and a new target in cancer. *Radiology and Oncology*. 37: 3.
23. Kresno, S.B. 2011. *Ilmu dasar onkologi*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
24. Reiche, Edna Maria Vissoci., Nunes, Sandra Odebrecht Vergas., Morimoto, Helena Kaminami. 2004. Stress, depression, the immune system, and cancer. *The lacet Oncology* Vol. 5 Pp. 617-624.