



CURRENT BIOCHEMISTRY
ISSN: 2355-7877
e-ISSN: 2355-7931
Journal homepage: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj>
Journal E-mail: current.biochemistry@gmail.com

CB Current
Biochemistry

Ekstrak dan Fraksi N-heksana Teh Hijau sebagai Antiproliferasi Sel Kanker Payudara MCM-B2 *In Vitro*

(N-hexane Extract and Fraction of Green Tea as Antiproliferation of MCM-B2 Breast Cancer Cells In Vitro)

Lisni Noraida W¹, Maria Bintang^{1*}, Bambang Pontjo P²

¹Department of Biochemistry, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

Received: 16 October 2018 ; Accepted: 1 July 2019

Corresponding author : Prof. Dr. Drh. Maria Bintang, MS; Departemen Biokimia, Jl. Agatis, Gd. Fapet, Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Email: maria_bintang@yahoo.com

ABSTRACT

Green tea (Camellia sinensis) is one of traditional plants that have potential as anticancer. The sample used in this research was commercial green tea extract. The purpose of this study was to test the antiproliferation activity of green tea extract on breast cancer cell MCM-B2 in vitro. Green tea extract was fractionated using three solvents, ie water, ethanol 70%, and n-hexane. Extract and water fraction of green tea have Lethality Concentration 50 (LC₅₀) value of more than 1000 ppm. Fractions of ethanol 70% and n-hexane had an LC₅₀ value of 883.48 ppm and 600.56 ppm, respectively. The results of phytochemical screening of green tea extract are flavonoids, tannins, and saponins, while the phytochemical screening results of n-hexane fraction are flavonoids and tannins. Antiproliferation activity was tested on breast cancer cells MCM-B2 and normal cells Vero by tripan blue staining method. The highest MCM-B2 cell inhibitory activity was achieved at a concentration of 13000 ppm green tea extract and 1000 ppm of n-hexane fraction, 59% and 59%, respectively. The extract and n-hexane fraction of green tea are not toxic to normal Vero cells characterized by not inhibiting normal cell proliferation.

Keywords: Antiproliferative, Cancer cell MCM-B2, Commercial green tea, Cytotoxicity

ABSTRAK

Teh hijau (Camellia sinensis) merupakan salah satu tanaman tradisional yang berpotensi sebagai antikanker. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak teh hijau komersil. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antiproliferasi ekstrak teh hijau terhadap sel kanker payudara MCM-B2 secara in vitro. Ekstrak teh hijau difraksinasi menggunakan tiga pelarut, yaitu air, etanol 70%, dan n-heksana. Ekstrak dan fraksi air teh hijau memiliki nilai Lethality Concentration 50 (LC₅₀) lebih dari 1000 ppm. Fraksi etanol 70% dan fraksi n-heksana teh hijau memiliki nilai LC₅₀, masing-masing sebesar 883.48 ppm dan 600.56 ppm. Hasil penapisan fitokimia ekstrak teh hijau adalah flavonoid, tanin, dan saponin, sedangkan hasil penapisan fitokimia fraksi n-heksana adalah flavonoid dan tanin. Aktivitas antiproliferasi diuji pada sel kanker payudara MCM-B2 dan sel normal Vero dengan metode pewarnaan tripan biru. Aktivitas penghambatan sel MCM-B2 tertinggi dicapai pada konsentrasi 13000 ppm ekstrak teh hijau dan

1000 ppm fraksi n-heksana, berturut-turut sebesar 59% dan 59%. Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau tidak bersifat toksik terhadap sel normal Vero yang ditandai dengan tidak menghambat proliferasi sel normal.

Kata kunci: Antiproliferasi, Sel kanker MCM-B2, Sitotoksisitas, Teh hijau komersil

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan masalah dalam bidang kedokteran yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan abnormalitas sel akibat mutasi DNA (Setiawan 2015). Penyakit kanker dapat dikatakan sebagai salah satu penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung koroner diseluruh dunia. Berdasarkan data WHO (2015), diketahui bahwa pada tahun 2012, terdapat sekitar 8.2 juta kematian akibat kanker diseluruh dunia. Jumlah penderita kanker di Indonesia seiring bertambahnya waktu menjadi semakin bertambah. Berdasarkan hasil dari rekapitulasi deteksi dini pemeriksaan penderita kanker di Indonesia dari tahun 2006 sampai 2016 menunjukkan jumlah penderita sebesar 1.9 juta jiwa (Kemenkes RI 2016). Jenis kanker yang menyebabkan kematian terbesar disetiap tahunnya adalah kanker payudara, kanker hati, kanker perut, dan kanker kolorektal (Kemenkes RI 2015).

Salah satu jenis kanker yang paling ditakuti terutama bagi kaum wanita, yaitu kanker payudara. Kanker payudara merupakan tumbuhnya sel-sel abnormal yang bersifat proliferasi secara terus-menerus pada jaringan payudara (Wahyuni 2015). Berdasarkan rekapitulasi deteksi dini di Indonesia dari tahun 2006 sampai 2016, jumlah penderita kanker payudara adalah sebesar 4 ribu jiwa (Kemenkes RI 2016). Pengobatan kanker payudara yang dikenal saat ini, yaitu operasi (pembedahan), radioterapi, dan kemoterapi. Pengobatan kanker dengan cara tersebut memiliki beberapa kelemahan. Operasi pada umumnya tidak efektif untuk sel yang telah mengalami

metastasis, radiasi tidak efektif dan tidak aman untuk sel-sel normal, sedangkan kemoterapi belum memberikan hasil yang optimal karena kerja obat tidak spesifik dan relatif mahal (Fadhli et al. 2012).

Obat kanker yang umumnya digunakan oleh penderita kanker adalah doksorubisin. Obat kanker tersebut menimbulkan efek samping bagi pemakainya, seperti rambut rontok, bibir menjadi kering, mual, muntah, dan gangguan pada jantung. Selain itu, doksorubisin tergolong obat hasil sintesis dan relatif mahal. Berdasarkan hal itu, penggunaan herbal sebagai pengobatan alternatif kanker menjadi semakin meningkat. Bahan baku obat-obatan tradisional mudah didapat, aman, relatif murah, dan efek sampingnya relatif lebih kecil dibandingkan obat sintesis (Atiqoh et al. 2011).

Salah satu tanaman tradisional yang memiliki khasiat sebagai antikanker, yaitu teh hijau. Teh hijau adalah jenis teh yang proses pembuatannya tidak melalui proses fermentasi, sehingga warnanya masih hijau. Teh hijau mengandung berbagai komponen kimia, diantaranya polifenol, florida, vitamin K, kafein, dan mineral. Senyawa bioaktif yang banyak terdapat pada teh hijau adalah katekin (Tohawa 2013). Katekin merupakan senyawa golongan flavonoid. Senyawa katekin yang tersusun dalam teh hijau, diantaranya epikatekin (EC), epikatekin-3-galat (ECG), epigalokatekin (EGC), epigalokatekin-3-galat (EGCG), dan galokatekin (GC) (Yuan et al. 2013). Katekin terutama epigalokatekin-3-galat yang terkandung dalam teh hijau lebih tinggi dari pada jenis teh lainnya (Tohawa 2013). Menurut Pratiwi (2017), melaporkan bahwa

teh hijau memiliki kandungan total fenol tertinggi sebesar 88.3170 mg GAE/g sampel dibandingkan dengan teh hitam dan teh rosela, sehingga mempunyai kemampuan bioaktif yang semakin baik.

Teh hijau tidak hanya berperan sebagai minuman, melainkan terdapat berbagai penelitian yang menyatakan bahwa teh hijau juga mampu meningkatkan kesehatan seseorang (Tohawa 2013). Menurut Purwanto (2011); Tabaga *et al.* (2015), epigalokatekin-3-galat tergolong jenis katekin yang paling banyak ditemukan pada teh hijau dan dapat menyebabkan apoptosis serta menghentikan siklus sel yang telah mengalami kerusakan DNA. Penelitian yang dilakukan Kusmiyati *et al.* (2015) dijelaskan bahwa teh hijau mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi yang ditandai dengan rendahnya nilai IC_{50} , yaitu 21.44 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} (*inhibition concentration*) adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50% (Tohawa 2012). Nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya semakin besar. Menurut Elsyana (2015), adanya aktivitas antioksidan diduga dapat berperan dalam mencegah terjadinya kanker.

2. METODOLOGI

Fraksinasi Ekstrak Teh Hijau Komesil (Firdausi *et al.* 2015 yang dimodifikasi)

Fraksinasi ekstrak teh hijau dilakukan dengan melarutkan 2 gram ekstrak teh hijau komersil dalam 150 mL pelarut. Fraksinasi dilakukan menggunakan tiga pelarut berdasarkan perbedaan tingkat kepolarannya, yaitu air (polar), etanol 70% (semi polar), dan n-heksana (non polar). Pembuatan fraksi air : n-heksana dilakukan dengan cara, yaitu sebanyak 2 gram ekstrak teh hijau dilarutkan dalam 150 mL akuades dan dimasukkan ke dalam corong pisah 500 mL. Setelah itu, 150

mL n-heksana ditambahkan dan dicampur sampai homogen. Campuran dikocok perlahan dan didiamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan n-heksana. Campuran dikocok dengan cara diputar-putar secara horizontal dan sesekali keran corong pisah harus dibuka, sehingga udara yang terperangkap dapat keluar dan tekanan udara menurun. Fraksi air dan fraksi n-heksana dipisahkan dan masing-masing disimpan dalam lemari pendingin untuk pengujian selanjutnya. Fraksinasi ekstrak teh hijau komersil dalam air : n-heksana diulang sebanyak 3 kali. Pembuatan fraksi etanol 70% : n-heksana dan n-heksana : air dilakukan dengan prosedur yang sama seperti di atas. Ketiga fraksi yang diperoleh, yaitu fraksi air, fraksi etanol 70%, dan fraksi n-heksana, masing-masing dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya dengan vakum pan evaporator pada suhu 60°C sampai kering.

Uji Sitotoksitas LC_{50} *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer *et al.* 1982)

Penetasan Larva Udang.

Larva udang *Artemia salina* Leach sebanyak 10 mg ditetaskan terlebih dahulu dalam 500 mL air laut yang telah disaring. Penetasan dilakukan pada suhu kamar dengan diterangi sinar lampu TL 14 watt dan diaerasi selama 48 jam.

Persiapan Larutan Uji

Larutan uji terdiri atas ekstrak teh hijau komersil, fraksi air, fraksi etanol 70%, dan fraksi n-heksana. Larutan stok masing-masing fraksi dibuat dalam konsentrasi 2000 ppm, yaitu dengan sebanyak 0.02 g fraksi dilarutkan dengan 10 mL air laut. Pengujian fraksi dilakukan dengan konsentrasi 1000, 800, 600, 400, 200, 100, dan 0 ppm. Larutan stok ekstrak teh hijau dibuat dalam konsentrasi sesuai dengan aturan pakai yang tertera dikemasan produk teh hijau komersil,

yaitu 13000 ppm. Larutan stok ekstrak 13000 ppm dibuat dengan sebanyak 1.95 g ekstrak dilarutkan dalam 150 mL air laut. Fraksi yang tidak larut dalam air ditambahkan dengan 50 μ L Tween80. Pengujian ekstrak dilakukan dengan konsentrasi 13000, 10000, 8000, 6000, 4000, 2000, 1000, 500, dan 0 ppm.

Uji Sitoksisitas

Air laut sebanyak 1 mL yang mengandung larva udang 10 ekor dimasukkan ke dalam mikroplat 12 sumuran dan ditambahkan 1000, 800, 600, 400, 200, dan 100 μ L larutan stok fraksi (2000 ppm), sedangkan untuk perlakuan ekstrak, ditambahkan 1000 μ L dari larutan stok 13000 ppm dan diencerin menjadi 10000, 8000, 6000, 4000, 2000, 1000, dan 500 ppm. Volume setiap sumuran dicukupkan hingga 2 mL dengan penambahan air laut. Setiap konsentrasi ekstrak dan fraksi teh hijau diuji sebanyak tiga kali ulangan. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar di bawah sinar lampu TL 14 watt. Setelah 24 jam, jumlah larva udang yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat. Kontrol (0 ppm) dilakukan dengan prosedur yang sama tanpa penambahan ekstrak dan fraksi teh hijau. Nilai LC_{50} ditentukan dengan menggunakan analisis probit program SPSS.

Uji Fitokimia (Harbone 2007 yang dimodifikasi)

Uji Flavonoid

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil ditimbang sebanyak 0.1 g ditambah 5 mL metanol, lalu dipanaskan pada suhu 50°C. Filtrat dipisahkan dan ditambahkan H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna merah yang terbentuk akibat penambahan H_2SO_4 pekat menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Uji Alkaloid

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil sebanyak 0.1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL kloroform dan 5 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan lalu ditambahkan dengan H_2SO_4 2 M sebanyak 1.5 mL. Kemudian, fraksi H_2SO_4 diambil, lalu dibagi ke dalam tiga tabung. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Dragendrof, tabung kedua dengan pereaksi Meyer, dan tabung ketiga dengan pereaksi Wagner. Alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendrof, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner.

Uji Tanin. Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil sebanyak 0.05 gram ditambah dengan air sebanyak 2.5 mL, kemudian dididihkan pada suhu 100°C selama 5 menit. Larutan tersebut ditambah dengan 1 tetes $FeCl_3$. Tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman.

Uji Saponin. Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau sebanyak 0.05 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2.5 mL akuades. Kemudian, dididihkan pada 100°C selama 5 menit dan kocok hingga berbusa. Saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil selama 15 menit.

Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil sebanyak 0.1 gram ditambah dengan 5 mL etanol 70%, kemudian dipanaskan, lalu disaring. Filtrat diuapkan dan ditambahkan dengan dietileter hingga larut. Fraksi dietil eter diambil dan ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat). Steroid ditunjukkan dengan terbentuknya

warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu.

Pengujian Aktivitas Ekstrak dan Fraksi Teh Hijau Komersil pada Sel Kanker *In Vitro* (Priosoeryanto *et al.* 1995).

Persiapan Media Sel Kanker

Sel lestari kanker MCM-B2 dan sel normal Vero dikultur menggunakan media pertumbuhan DMEM sebanyak 800 μL dalam mikropelat 24 sumuran. Media disetiap sumuran ditambahkan antibiotik (penisilin-streptomisin) 50 μL , fungizon 50 μL , dan serum (FCS) 50 μL , serta ekstrak dan fraksi teh hijau komersil sebanyak 50 μL . Fraksi yang digunakan adalah fraksi yang bersifat toksik berdasarkan uji toksisitas dengan BSLT, yaitu fraksi n-heksana. Sampel lain yang diuji antiproliferasinya adalah ekstrak teh hijau komersil.

Perlakuan Ekstrak. Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel MCM-B2, sedangkan sel normal yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel Vero. Suspensi sel kanker dan sel normal dalam ampul (*cryovial*) dicairkan (*thawing*), lalu dihomogenkan dengan vorteks. Suspensi sel (7×10^6 sel/mL) dimasukkan ke dalam sumur-sumur mikropelat sebanyak 50 μL . Tiap-tiap sumur telah berisi media bersuplemen, ekstrak, dan fraksi n-heksana dari teh hijau komersil. Kontrol positif yang digunakan adalah doksorubisin 100 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan kontrol negatif hanya berisi suspensi sel dan media dengan prosedur yang sama. Volume total setiap sumuran adalah 1 mL. Semua perlakuan dilakukan dalam tiga kali ulangan. Kultur sel kanker diinkubasi pada inkubator dengan kondisi 5% CO_2 , 37°C selama 3 hari.

Pemanenan dan Penghitungan Sel

Sel dipanen setelah 3 hari, yaitu ketika pertumbuhan sel dikontrol negatif telah menutupi sekitar 70% permukaan sumuran (konfluen). Sel kanker dan sel normal sebanyak 80 μL dimasukkan ke dalam sumuran mikropelat yang telah berisi 20 μL pewarna tripan biru, kemudian dihomogenkan. Sel dipipet sebanyak 80 μL dan ditetaskan pada *chamber* hemasitometer ditutup dengan *cover slip*. Sel dihitung menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Sel yang dihitung adalah sel yang berada pada kotak tengah kamar dan dihitung baik sel yang mati (biru) maupun sel hidup (bening), yang disebut total sel. Hasil perhitungan sel dikonversikan ke dalam jumlah sel per mL suspensi dan persentase dari data yang diperoleh dengan menghitung jumlah sel yang hidup dan mati, dihitung dengan persamaan berikut.

Proliferasi (%)

$$= \frac{\text{Jumlah total sel yang diberi ekstrak}}{\text{Total sel kontrol negatif}} \times 100\%$$

Aktivitas penghambatan (%) = 100% - (% Proliferasi)

3. HASIL

Rendemen Fraksi dari Ekstrak Teh Hijau Komersil

Fraksinasi sampel dengan pelarut air menghasilkan rendemen fraksi yang paling tinggi dibandingkan dengan pelarut etanol 70% dan n-heksana, yaitu sebesar 93.74% (Tabel 1). Fraksinasi ekstrak teh hijau komersil dengan air, etanol 70%, dan n-heksana, masing-masing menghasilkan rendemen secara berturut-turut adalah 93.74%, 5.91%, dan 3.47% (Tabel 1).

Tabel 1. Rendemen hasil fraksinasi teh hijau komersil

Sampel	Rendemen (%)
Fraksi air	93.74
Fraksi etanol 70%	5.91
Fraksi n-heksana	3.47

Sitotoksitas Ekstrak dan Fraksi dari Teh Hijau Komersil

Larutan uji yang digunakan dalam uji sitotoksitas terhadap larva udang adalah ekstrak teh hijau komersil, fraksi air, fraksi etanol 70%, dan fraksi n-heksana. Ekstrak teh hijau komersil dan fraksi air memiliki nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) lebih besar dari 1000 ppm, masing-masing adalah 14330.31 ppm dan 1415.60 ppm (Tabel 2). Ekstrak teh hijau komersil dan fraksi air tidak bersifat toksik. Fraksi n-heksana dan fraksi etanol 70% mampu mematikan larva udang ditandai dengan memiliki nilai LC₅₀ lebih kecil dari 1000 ppm, masing-masing adalah 600.53 ppm dan 883.48 ppm (Tabel 2). Fraksi n-heksana memiliki nilai LC₅₀ yang lebih kecil dibandingkan dengan fraksi etanol 70%, sehingga fraksi n-heksana tergolong lebih toksik dibandingkan dengan fraksi etanol 70%. Nilai LC₅₀ ditentukan dengan menggunakan analisis probit program SPSS.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ ekstrak dan fraksi teh hijau komersil

Sampel	LC ₅₀
Ekstrak teh hijau komersil	14330.31
Fraksi air	1415.60
Fraksi etanol 70%	883.48
Fraksi n-heksana	600.53

Komponen Fitokimia Ekstrak dan Fraksi n-heksana Teh Hijau Komersil

Sampel yang akan diuji komponen fitokimia adalah sampel yang tergolong toksik berdasarkan uji sitotoksitas dengan BSLT. Sampel yang tergolong toksik, yaitu fraksi n-heksana. Fraksi n-heksana memiliki tingkat toksitas yang lebih baik dibandingkan fraksi air dan fraksi etanol 70%. Ekstrak teh hijau komersil tergolong tidak toksik berdasarkan metode BSLT, namun dilakukan uji fitokimianya karena secara empiris tergolong minuman kesehatan antikanker yang umumnya diminum oleh konsumen. Ekstrak teh hijau komersil menunjukkan hasil positif

terhadap flavonoid, saponin, dan tanin serta negatif terhadap alkaloid, steroid, dan triterpenoid. Fraksi n-heksana menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid dan tanin serta negatif terhadap saponin, steroid, dan triterpenoid. Hasil uji kualitatif kandungan fitokimia ekstrak dan fraksi n-heksana dari teh hijau dapat dilihat pada Tabel 3.

Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak dan Fraksi n-heksana Teh Hijau Komersil

Pengujian aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan menggunakan sampel yang bersifat toksik berdasarkan uji sitotoksitas dengan BSLT.

Tabel 3. Hasil uji kualitatif komponen fitokimia ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil

Komponen fitokimia	Ekstrak teh hijau komersil	Fraksi n-heksana
Flavonoid	+	+
Alkaloid	-	-
Saponin	+	-
Tanin	+	+
Steroid	-	-
triterpenoid	-	-

Keterangan :

(+) : Mengandung metabolit sekunder

(-) : Tidak mengandung metabolit sekunder

Sampel yang bersifat toksik berdasarkan metode BSLT, yaitu fraksi n-heksana. Selain itu, sampel yang akan diuji aktivitas antiproliferasinya adalah ekstrak teh hijau komersil sebagai minuman kesehatan antikanker. Hasil penelitian secara umum menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil secara nyata ($p < 0.05$) mampu menurunkan pertumbuhan sel kanker MCM-B2. Pengaruh pemberian ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil terhadap pertumbuhan sel kanker MCM-B2 ditunjukkan pada Gambar 3.

Aktivitas penghambatan pada sel kanker MCM-B2 dengan pemberian ekstrak teh hijau komersil konsentrasi 13000, 10000, 8000, 6000, 4000, dan 2000 ppm tampak

tidak berbeda nyata. Demikian juga aktivitas penghambatan pada sel kanker MCM-B2 dengan pemberian fraksi n-heksana konsentrasi 1000, 800, 600, 400, dan 200 ppm tampak tidak berbeda nyata. Aktivitas penghambatan sel kanker MCM-B2 dengan pemberian ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil tampak berbeda nyata dengan kontrol negatif.

Aktivitas penghambatan terhadap sel kanker MCM-B2 meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dan fraksi n-heksana yang digunakan. Ekstrak teh hijau komersil dengan konsentrasi 13000 ppm mampu menghambat pertumbuhan sel kanker MCM-B2 paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya, yaitu sebesar 58.64% (Gambar 1). Konsentrasi 13000 ppm merupakan perhitungan konsentrasi berdasarkan aturan pakai dari minuman kesehatan antikanker ekstrak teh hijau komersil. Fraksi n-heksana teh hijau juga mampu menghambat sel kanker MCM-B2 paling tinggi, yaitu dengan konsentrasi 1000

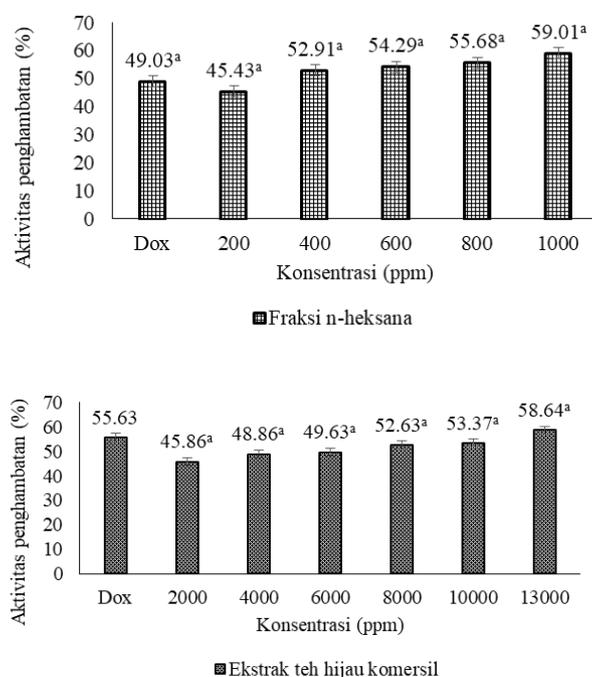
ppm sebesar 59.01% (Gambar 1). Aktivitas penghambatan ekstrak dan fraksi n-heksana terhadap sel kanker MCM-B2 lebih baik dibandingkan dengan kontrol positif (doksorubisin).

4. PEMBAHASAN

Rendemen Fraksi dari Ekstrak Teh Hijau Komersil

Fraksinasi ekstrak teh hijau komersil dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, diantaranya air, etanol 70%, dan n-heksana. Fraksinasi bertujuan memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya (Kantor *et al.* 2015). Fraksinasi ekstrak teh hijau komersil dengan air, etanol 70%, dan n-heksana, masing-masing menghasilkan rendemen secara berturut-turut adalah 93.74%, 5.91%, dan 3.47% (Tabel 1).

Fraksi air menghasilkan rendemen paling tinggi, diikuti fraksi etanol 70% dan fraksi n-heksana (Tabel 1).



Gambar 1. Aktivitas penghambatan sel kanker MCM-B2 setelah pemberian ekstrak dan fraksi n- heksana teh hijau komersil

Keterangan : Huruf *superscript* yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata pada taraf uji 5% uji Duncan

Tabel 4. Aktivitas penghambatan sel normal Vero setelah pemberian ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau

Ekstrak teh hijau		Fraksi n-heksana	
Konsentrasi (ppm)	Aktivitas penghambatan (%)	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas penghambatan (%)
Kontrol negatif	0 ^a	Kontrol negatif	0 ^a
Dox (100 ppm)	35.38 ^b	Dox (100 ppm)	35.38 ^b
2000	0.64 ^a	400	1.21 ^a
13000	1.82 ^a	600	2.42 ^a
		800	3.64 ^a
		1000	6.06 ^a

Keterangan : Huruf *superscript* yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata pada taraf uji 5% uji Duncan

Hal ini menunjukkan bahwa kandungan fitokimia dalam ekstrak teh hijau bersifat polar (Elsyana 2015). Berdasarkan penelitian Wijayanto (2013), nilai rendemen fraksi paling yang tinggi menunjukkan semakin banyak senyawa yang terfraksi dalam sampel. Menurut Brown *et al.* (2015), semakin tinggi indeks kepolaran suatu pelarut, maka sifatnya semakin polar. Berdasarkan literatur, indeks kepolaran air, etanol 70%, dan n-heksana berturut-turut adalah 9.0, 5.2, dan 0.1 (Brown *et al.* 2015; Padmasari *et al.* 2013). Tinggi rendahnya persentase rendemen fraksi disebabkan oleh perbedaan tingkat kepolaran pelarut. Air tergolong pelarut dengan tingkat kepolaran yang tinggi, sehingga menghasilkan rendemen fraksi yang paling tinggi. Rendemen pada etanol 70% lebih kecil dibandingkan air, namun lebih besar dari pelarut n-heksana, hal ini diduga sifat kepolaran etanol 70% yang terdiri atas 30% air, sehingga tidak dapat memfraksi senyawa yang terkandung dalam ekstrak teh hijau komersil dalam jumlah yang banyak. Nilai rendemen yang terkecil terdapat pada fraksi n-heksana, hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang bersifat non polar pada sampel ekstrak teh hijau komersil jumlahnya sedikit (Brown *et al.* 2015).

Sitotoksitas Ekstrak dan Fraksi n-heksana Teh Hijau Komersil

Metode BSLT (*brine shrimp lethality test*) merupakan uji pendahuluan untuk menentukan kadar toksisitas dan aktivitas farmakologis suatu bahan alam serta praskrining terhadap senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Kelebihan metode BSLT, yaitu waktu ujinya cepat, pengerjaannya mudah dan sederhana, biaya relatif murah, tidak memerlukan teknik aseptik, dan memerlukan sedikit sampel (Agustini 2017).

Hewan uji yang digunakan dalam metode BSLT adalah larva udang *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach digunakan sebagai hewan uji karena dapat bertahan pada kondisi kering, dapat disimpan dalam waktu yang lama, memiliki membran yang tipis dan analogi dengan membran sel tipis untuk mengukur efek toksisitas suatu bahan, serta proses penetasan larva berlangsung dalam waktu yang cepat, yaitu 48 jam. Proses penetasan udang dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya suhu, aerasi, cahaya, dan kadar garam (Agustini 2012). Menurut Agustini (2017), penggunaan *Artemia salina* L. sebagai hewan uji karena identik dengan sel kanker, sehingga apabila suatu ekstrak yang digunakan memiliki aktivitas yang tinggi, maka ekstrak tersebut dapat berpotensi sebagai obat di masa yang akan datang. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian berumur 2 hari (48 jam) karena larva berada dalam keadaan yang

mana dinding selnya masih kondisi lunak, sehingga ekstrak yang diujikan dapat menimbulkan efek yang diinginkan (Rizqiyah 2014).

Pengujian sitotoksitas dilakukan untuk mendapatkan persen data kematian yang dinyatakan dalam *Lethality concentration* 50 (LC₅₀). LC₅₀ merupakan konsentrasi yang dapat mematikan 50% populasi larva udang. Nilai LC₅₀ yang semakin rendah mengindikasikan bahwa suatu ekstrak tersebut semakin tinggi toksisitasnya dan berpotensi membunuh sel kanker (Elsyana 2015). Berdasarkan indeks toksisitas Meyer *et al.* (1982), suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikannya apabila dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji dengan nilai LC₅₀ < 1000 ppm, sedangkan ekstrak dengan nilai LC₅₀ > 1000 ppm disebut tidak toksik. Menurut Mentor *et al.* (2014), ekstrak dengan nilai LC₅₀ 500 > 1000 ppm, disebut toksisitas rendah, ekstrak dengan nilai LC₅₀ 100 > 500, disebut toksisitas menengah, dan ekstrak dengan nilai LC₅₀ 0 < 100 ppm, disebut sangat toksik.

Berdasarkan analisis probit, ekstrak teh hijau komersil dan fraksi air tidak bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ di atas 1000 ppm (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan kemampuan bioaktivitas ekstrak teh hijau komersil dan fraksi air rendah dan diduga tidak adanya kerja sama yang sinergis antara metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi air teh hijau komersil, sehingga toksisitasnya sangat kecil (Pasilala *et al.* 2016). Fraksi etanol 70% dan fraksi n-heksana memiliki tingkat toksisitas yang baik dibandingkan ekstrak dan fraksi air teh hijau (Tabel 2). Hal ini ditandai dengan nilai LC₅₀ dibawah 1000 ppm, sehingga mampu mematikan setengah populasi larva. Namun, fraksi n-heksana memiliki nilai LC₅₀ yang lebih kecil dari fraksi etanol 70%, sehingga dapat dikatakan bioaktivitas fraksi n-heksana

lebih aktif dibandingkan fraksi etanol 70%. Indeks toksisitas fraksi n-heksana berdasarkan Mentor *et al.* (2014) tergolong toksisitas rendah, namun mampu membunuh setengah populasi larva dibawah konsentrasi 1000 ppm, sehingga dapat dikatakan berpotensi sebagai antikanker.

Kematian larva udang tersebut berkaitan dengan kandungan fitokimia yang dimilikinya. Flavonoid yang terkandung dalam fraksi teh hijau berpotensi sebagai penyebab kematian *Artemia salina* L. Senyawa flavonoid dapat bertindak sebagai racun perut yang akan mengganggu alat pencernaan larva dan juga menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Oleh karena itu, larva gagal mendapatkan stimulus rasa yang membuatnya tidak mampu mengenali makanannya, sehingga larva mati kelaparan (Dapas *et al.* 2014).

Komponen Fitokimia Ekstrak dan Fraksi n-heksana Teh Hijau Komersil

Sampel yang diuji fitokimianya pada penelitian ini, yaitu berdasarkan uji sitotoksitas dengan BSLT. Sampel yang tergolong lebih toksik, yaitu fraksi n-heksana. Ekstrak teh hijau komersil bersifat tidak toksik, namun dilakukan uji fitokimianya karena secara empiris tergolong produk herbal antikanker yang dikonsumsi saat ini oleh penderita kanker maupun yang tidak menderita kanker. Uji fitokimia bertujuan mendeteksi senyawa-senyawa metabolit sekunder yang akan berperan dalam pengujian aktivitas antikanker. Hasil uji fitokimia dari ekstrak teh hijau komersil memberikan hasil uji positif terhadap flavonoid, tanin, dan saponin (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau komersil yang digunakan dalam penelitian ini tidak mengandung senyawa alkaloid, steroid, dan triterpenoid. Hasil uji fitokimia dari fraksi n-

heksana teh hijau memberikan hasil positif terhadap flavonoid dan tanin (Tabel 3).

Penelitian Andaryekti *et al.* (2015), melaporkan bahwa ekstrak teh hijau etanol 70% memberikan hasil positif terhadap flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Hasil berbeda juga dilaporkan oleh Ardiansyah *et al.* (2015), melaporkan bahwa ekstrak air daun teh hijau memberikan hasil positif terhadap flavonoid dan tanin, sedangkan fraksi n-heksana memberikan hasil positif terhadap flavonoid. Hasil uji fitokimia dari fraksi n-heksana teh hijau memberikan hasil positif terhadap flavonoid dan tanin. Menurut Marvibaigi *et al.* (2014), tanaman dengan spesies sama mengandung metabolit sekunder yang bervariasi karena tergantung dari jenis tanaman inang dan lokasi tempat tumbuhnya. Artanti *et al.* (2012), menunjukkan bahwa kandungan fitokimia teh hijau dapat ditentukan berdasarkan pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi. Berdasarkan penelitian Elsyana (2015), juga melaporkan bahwa kandungan fitokimia yang terdapat pada masing-masing sampel tergantung dari kepolaran pelarut yang digunakan.

Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak dan Fraksi n-heksana Teh Hijau Komersil

Aktivitas antiproliferasi ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil diuji pada sel kanker payudara (MCM-B2) dan sel normal (sel Vero). Sel MCM-B2 merupakan sel kanker yang diisolasi dari payudara anjing. Sel Vero sering digunakan dalam berbagai penelitian untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia. Selain itu, sel ini juga direkomendasikan sebagai sel model dalam mempelajari karsinogenesis secara *in vitro* (Senthilraja dan Kathiresan 2015).

Aktivitas antiproliferasi ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau diuji dengan

pewarnaan tripan biru. Prinsip pewarnaan dengan tripan biru adalah sel yang telah mati akan terlihat berwarna biru akibat terjadinya lisis, sehingga protein dalam plasmanya berikatan dengan tripan biru. Metode pewarnaan tripan biru dapat membedakan antara sel hidup dan sel mati. Sel yang hidup akan tampak membulat, berwarna bening, dan bentuknya masih utuh, sehingga tripan biru tidak dapat masuk ke dalam sel. Sel yang mati memiliki bentuk yang sudah tidak beraturan akibat telah mengalami lisis dan nekrosis, berwarna biru tua, dan ukurannya lebih besar dari pada sel hidup. Perhitungan sel dilakukan dengan menghitung jumlah yang masih ada baik sel hidup maupun sel mati ketika diberi ekstrak dan dibandingkan dengan kontrol negatif yang tidak diberi ekstrak. Sel hidup dan sel mati diamati di bawah mikroskop menggunakan hemasitometer (Djajanegara dan Wahyudi 2009).

Ekstrak teh hijau komersil tidak bersifat toksik terhadap *Artemia salina* namun mampu menghambat proliferasi sel kanker. Menurut Priosoeryanto *et al.* (1995), sel kanker MCM-B2 tergolong tipe sel yang belum terdiferensiasi karena berasal dari sel induk atau sel atipikal, sehingga apabila pertumbuhan selnya diganggu dengan pemberian ekstrak teh hijau komersil, maka menyebabkan banyak sel terhambat aktivitas proliferasinya. *Artemia salina* yang digunakan dalam penelitian ini adalah berumur 48 jam, pada umur ini anggota tubuh larva sudah lengkap dan telah memiliki saluran pencernaan yang sempurna, sehingga dengan penambahan ekstrak teh hijau komersil tidak mampu membunuh setengah populasi larva, melainkan hanya mampu membunuh beberapa ekor larva saja (Muaja *et al.* 2013).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau dan fraksi n-heksana secara nyata ($p < 0.05$) mampu menurunkan pertumbuhan sel kanker

payudara (MCM-B2) dan tidak membunuh sel normal (sel Vero). Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan pada sel kanker MCM-B2 dengan pemberian ekstrak teh hijau konsentrasi 13000, 10000, 8000, 6000, 4000, dan 2000 ppm tampak tidak berbeda nyata (Gambar 1). Aktivitas penghambatan yang tidak berbeda nyata juga ditunjukkan oleh pemberian fraksi n-heksana konsentrasi 1000, 800, 600, 400, dan 200 ppm (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau memiliki aktivitas penghambatan sel kanker yang hampir sama pada setiap konsentrasi yang digunakan. Aktivitas penghambatan ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau semakin meningkat seiring dengan konsentrasi yang digunakan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau dengan konsentrasi masing-masing, yaitu 13000 ppm dan 1000 ppm dapat menekan pertumbuhan sel kanker tertinggi secara berturut-turut, yaitu 58.64% dan 59.01% (Gambar 1). Fraksi n-heksana mencapai aktivitas penghambatan sel kanker yang tinggi dengan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak teh hijau komersil. Rismana *et al.* (2013) menjelaskan bahwa fraksi memiliki kualitas lebih murni dan penggunaannya lebih mudah karena telah dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya, sehingga meningkatkan kandungan senyawa yang diinginkan dan menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan. Ekstrak memiliki senyawa aktif yang masih tergolong kasar karena bercampur dengan senyawa lain akibat tidak melalui proses pemisahan senyawa.

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil dapat menghambat proliferasi kanker karena adanya katekin terutama epigallocatekin-3-galat. Katekin merupakan golongan flavonoid yang memodulasi berbagai gen yang terlibat dalam

perkembangan dan proses terjadinya kanker. Komponen fenolik di dalam teh hijau terdapat sekitar 30-42% dari berat kering dan epigallocatekin-3-galat (EGCG) tergolong senyawa katekin yang melimpah sekitar 50-80% dari total katekin (Rahmani *et al.* 2015).

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau juga diuji antiproliferasinya pada sel normal Vero. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan ekstrak teh hijau komersil terhadap sel Vero menurun pada konsentrasi 13000 ppm dan 2000 ppm, masing-masing sebesar 1.82% dan 0.64% (Tabel 4). Fraksi n-heksana juga menunjukkan bahwa aktivitas penghambatannya terhadap sel Vero menurun pada konsentrasi 1000 ppm dan 200 ppm, masing-masing sebesar 6.06% dan 1.21% (Tabel 4). Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksana tidak memiliki efek toksik dan relatif aman terhadap sel normal karena senyawa flavonoid yang terkandung didalamnya.

Berdasarkan penelitian Mustariani (2011), melaporkan bahwa suatu ekstrak atau fraksi tidak memiliki efek toksik terhadap sel normal apabila hanya menghambat proliferasi sel sebesar 19.77%. Selain itu, Ren *et al.* (2003), menjelaskan bahwa flavonoid dapat menginduksi apoptosis pada beberapa jenis sel kanker tanpa mengganggu aktivitas proliferasi sel normal karena bekerja secara selektif hanya pada kanker saja. Doksorubisin sebagai obat sintetis kanker menghambat aktivitas sel normal Vero sebesar 35.38%, melebihi batas hambat proliferasi sel normal. Hal ini disebabkan oleh gugus kuinon yang mampu menghasilkan radikal bebas baik pada sel normal maupun pada sel kanker (Hatim 2012).

Mekanisme teh hijau dalam menghambat pertumbuhan kanker terdiri atas 4 tahapan. Tahap pertama, yaitu teh hijau bertindak sebagai inhibitor siklooksigenase,

lipoksigenase, faktor nekrosis tumor, dan jalur interleukin yang pada akhirnya mengontrol perkembangan dan proses pembentukan kanker. Tahap kedua, yaitu teh hijau menunjukkan efek kemopreventif melalui aktivasi gen penekan tumor, seperti p53 dan PTEN/p21, regulasi apoptosis (bcl2/Bax), dan menghambat *angiogenesis* serta faktor transkripsi lainnya yang terlibat dalam perkembangan kanker. Tahap ketiga, yaitu teh hijau berperan menetralkan radikal bebas dan merusak makromolekul yang dinetralkan oleh kapasitas antioksidan yang tinggi yang pada akhirnya mencegah patogenesis tumor. Tahap keempat, yaitu mekanisme yang lain dari teh hijau dalam mencegah kanker melalui modulasi gen yang terlibat dalam inisiasi, promosi, dan perkembangan kanker (Rahmani et al. 2015).

Ekstrak dan fraksi n-heksana teh hijau komersil mengandung flavonoid yang dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara dan tidak memiliki efek toksik terhadap sel normal secara *in vitro*. Penelitian lebih lanjut mengenai pengujian antiproliferasi ekstrak teh hijau secara *in vivo*, identifikasi senyawa antikanker, dan pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak teh hijau komersil sebagai obat antikanker komersil perlu dilakukan untuk menambahkan informasi tentang kemampuan bioaktivitas ekstrak teh hijau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pembimbing Skripsi saya Prof. Dr. Drh. Maria Bintang, MS dan Prof. Drh. Bambang Pontjo P, MS, PhD, APVet, DACCM, yang telah membantu dalam mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

[WHO] World Health Organization. 2015. Prevalence of cancer worldwide [Internet]. [diunduh 25 Januari 2018].

Tersedia pada <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

- Agustini NWS. 2012. Aktivitas antioksidan dan uji toksisitas hayati pigmen fikobiliprotein dari ekstrak *Spirulina platensis*. *Proceeding Biology Education Conference*. 9(1):2528-5742.
- Agustini NWS. 2017. Identifikasi senyawa aktif dan toksisitas hayati ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol mikroalga *Tetraselmis chuii* secara brine shrimp lethality test (BSLT). *Warta IHP*. 34(1):8-17.
- Andaryekti R, Mufrod, Munisih S. 2015. Pengaruh basis gel sediaan masker ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* Linn) pada karakteristik fisik dan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Majalah Farmaseutik*. 11(2):294-299.
- Ardiansyah SA, Adirestuti P, Desmiaty Y. 2015. Pengujian ekstrak air dan fraksi-fraksi daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terhadap aktivitas bakteri penyebab jerawat (*Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*). *JSTFI*. 4(1):28-35.
- Artanti N, Firmansyah T, Darmawan A. 2012. Bioactivities evaluation of Indonesian mistletoes (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) leaves extracts. *JAPS*. 2(1):24-27.
- Atiqoh H, Wardani RS, Meikawati W. 2011. Uji antidiabetik infusa kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi glukosa. *J kesehatan Masyarakat Indones*. 7(1):43-50.
- Brown ET, Leemay E, Bursten B, Murphy C, Woodwark P. 2015. *The Central Chemistry 13th Edition*. USA (US): Pearson Education Inc.
- Dapas CC, Koleangan HSJ, Sangi M. 2014. Analisis senyawa metabolit sekunder dan uji toksisitas ekstrak batang bawang laut (*Proiphys amboinensis* L). *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 3(2):144-148.

- Djajanegara, Wahyudi P. 2009. Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksitas fraksi etanol biji mimba (*Azadirachta indica*). *Biosfera*. 26(2):59-64.
- Elsyana V. 2015. Identifikasi senyawa antikanker dan uji aktivitas antiproliferasi ekstrak daun benalu cengkik (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) [tesis]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana IPB.
- Fadhli H, Teruna HY, Jose C. 2012. Uji toksisitas ekstrak kulit batang pulau basung (*Alstonia spatulata* BL) dengan metode brine shrimp lethality test. *J Ind Che Acta*. 3(1):10-15.
- Faramayuda F, Alatas F, Desmiaty Y. 2010. Formulasi sediaan losion antioksidan ekstrak air daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.). *Majalah Obat Tradisional*. 15(3):105-111.
- Firdausi I, Retnowati R, Sutrisno. 2015. Fraksinasi ekstrak metanol daun mangga kasturi (*Mangifera casturi Kosterm*) dengan pelarut n-butanol. *Kim Stud Jour*. 1(1):785-790.
- Hatim NB. 2012. Aktivitas antikanker ekstrak etanol daun surian (*Toona sinensis*) pada tikus betina *Sparague-Dawley* yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)antrasena [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Harborne JB. 2007. *Phytochemical Methods : A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London (EN): Chapman and Hall.
- Kantor MNN, Wewengkang DS, Wullur AC. 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak karang lunak *Xenia* sp. yang diperoleh dari Teluk Manado. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4(3):2302-2493.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. *Situasi Penyakit Kanker*. Jakarta (ID): Kepala Pusat Data dan Informasi.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. *Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta (ID): Kepala Pusat Data dan Informasi.
- Kusmiyati M, Sudaryat Y, Lutfiah IA, Rustamsyah A, Rohdiana D. 2015. Aktivitas antioksidan, kadar fenol total, dan flavonoid total dalam teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) asal tiga perkebunan Jawa Barat. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*. 18(2):101-106.
- Mentor RH, Blagica J, Tatjana KP. 2014. Toxicological evaluation of the plant product using brine shrimp (*Artemia salina* L) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60(1):9-18.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal Medicinal Plant Research*. 45:31-34.
- Muaja AD, Koleangan HSJ, Runtuwene MRJ. 2013. Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 2(2):115-118.
- Mustariani BAA. 2011. Potensi kaempferol daun sirsak sebagai penghambat proliferasi sel kanker ragi [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Padmasari PD, Astuti KW, Warditiani NK. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etanol 70% rimpang bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Farmasi Udayana*. 2(4):2301-7716.
- Pasilala FB, Daniel, Saleh C. 2016. Uji toksisitas (brine shrimp lethality test) dan aktivitas antioksidan dari daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides*) dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 14(1):13-17.
- Pratiwi G. 2017. Performace kapasitas antioksidan teh kulit manggis, teh hitam, teh hijau, dan teh rosela [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Priosoeryanto BP, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K. 1995. Establishment of cell line (MCM-B2) from a benign mixed tumour of canine mammary gland. *Research in Veterinary Science*. 58:272-276.
- Purwanto DA. 2011. Analisis kadar o^6 -[H³]metilguanin-DNA pada kultur hepatosit tikus menggunakan liquid scintillation counter setelah pemberian epigalokatekin-galat dari teh hijau. *Jurnal Kedokteran Indonesia*. 2(1):5-10.
- Rahmani AH, Shabrmi FM, Allemailem KS, Aly SM, Khan MA. 2015. Review article: implications of green tea and its constituents in the prevention of cancer via the modulation of cell signalling pathway. *BioMed Research International*. 10:1-12. doi:dx.doi.org/10.1155/2015/925640.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 23(4):519-534.
- Rismania E, Rosidah I, Prasetyawan Y, Bunga O, Erna Y. 2013. Efektivitas khasiat pengobatan luka bakar sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan berdasarkan analisis hidroksiprolin dan histopatologi pada kulit kelinci. *Bul.Penelit.Kesehat*. 41(1):45-60.
- Rizqiyah AH. 2014. Uji sitotoksik akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) dengan variasi pelarut melalui metode BSLT dan identifikasi golongan senyawa aktifnya [skripsi]. Malang (ID): Universitas Islam Negeri.
- Setiawan SD. 2015. The effect of chemotherapy in cancer patient to anxiety. *Journal Majority*. 4(4): 96-99.
- Senthilraja P, Kathiresan K. 2015. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of marine yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(3):80-84.
- Tabaga KD, Durry FM, Kairupan C. 2015. Efek seduhan teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap gambaran histopatologi payudara mencit yang diinduksi benzo(a)pyrene. *e- Biomedik*. 3(2):544-548.
- Tohawa J. 2012. Manfaat Eugenol cengkeh pada berbagai industri di Indonesia. *Perspektif*. 11(3):91-101.
- Tohawa J. 2013. Kandungan senyawa kimia pada daun teh (*Camellia sinensis*). *Warta Pertanian dan Pengembangan Tanaman Industri*. 19(3):12-16.
- Wahyuni T. 2015. Hubungan antara frekuensi kemoterapi dengan kualitas hidup perempuan dengan kanker payudara yang menjalani kemoterapi di ruang kemoterapi RSUD A.M parikesit tenggarong. *Jurnal Ilmu Kesehatan*. 3(2):1-13.
- Wang P, Vadgama JV, Said JW, Magyar CE, Doan N, Heber D, Henning SM. 2014. Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea. *J Nutr Biochem*. 25(1):1-17.
- Yuan JM. 2013. Cancer prevention by green tea: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 98:1676S-81S. doi:10.3945/ajcn.113.058271.