

## THE CYTOTOXIC AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF COCOA POD HUSK EXTRACT (*THEOBROMA CACAO L.*) ON PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS

Yani Corvianindya Rahayu\*, Iin Eliana Triwahyuni \*\*, Dewi Yunita Sari\*\*\* Banun Kusumawardhani\*\*\*\*,

\*Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

\*\*Departemen Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

\*\*\*Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

\*\*\*\*Departemen Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Correspondence: [yani.fkg@unej.ac.id](mailto:yani.fkg@unej.ac.id)

### Keywords:

Cocoa pod husk;  
Cytotoxicity; Proliferative;  
Periodontal ligament  
fibroblasts

### ABSTRACT

**Background:** Theobroma cacao was considered agricultural wastes. Cocoa pod husk contain various bioactive compounds as natural antioxidants, antibacterial and anti-inflammatory. A good biomaterial must be non-toxic and have no detrimental effect on the biological environment. The aim of research was to determine the cytotoxicity and proliferative activity of cocoa pod husk extract on primary cells of periodontal ligament fibroblasts.

**Method:** This experimental laboratory used primary cell culture of periodontal ligament fibroblasts. The cytotoxicity and proliferative activity were analyzed by MTT assay [2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Extraction of cacao pods were obtained using the ultrasonic homogenizer method with ethanol 70%. The cytotoxicity test was observed for 24 hours and the doubling time proliferative test was observed for 24, 48, and 72 hours.

**Result:** Cocoa pod husk extract showed there were no cytotoxic effects with viability of primary cells of periodontal ligament fibroblasts at the concentration of 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml. The proliferation test showed increasing of fibroblasts at 24 and 48 hours. Kruskal Wallis analysis obtained a significance value ( $p < 0.05$ )

**Conclusion:** Cytotoxicity and proliferation assays of Cocoa pod husk extract increased cell viability and cell proliferation of periodontal ligament fibroblast.

### PENDAHULUAN

Rongga mulut mencerminkan kesehatan tubuh secara umum karena merupakan *port de entry* pertama masuknya makanan. Penyakit rongga mulut bisa bersifat jinak atau ganas maupun yang dapat sembuh sendiri (*self limiting*). Kondisi tersebut bisa terjadi tanpa atau dengan keluhan, sehingga dapat mengganggu fungsi dan kenyamanan dari rongga mulut yang dapat menyebabkan terjadinya defisiensi nutrisi.<sup>1,2</sup> Pengelolaan penyakit mulut biasanya sangat kompleks, umumnya masyarakat akan mengkonsumsi obat-obatan. Beberapa obat non-steroid anti inflamasi memiliki efek samping seperti gangguan saluran cerna, hipertensi, dan

perdarahan, sehingga, diperlukan suatu bahan alami yang memiliki efek samping seminimal mungkin tetapi memiliki efektivitas tinggi.<sup>3,4</sup>

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan limbah dari industri pengolahan coklat. Jember merupakan produsen kakao terbesar di Jawa Timur, selama ini hanya memanfaatkan limbah kulit kakao sebagai pakan ternak saja. Kulit biji kakao diketahui kaya dengan kandungan polifenol, dan kandungan flavonolnya lebih tinggi dibanding dengan tanaman lain, Polifenol merupakan senyawa fitokimia berupa flavonoid, tannin, proantosianidin, katekin, dan epikatekin.<sup>5</sup> Polifenol dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, dan antibakteri. Polifenol juga

memiliki manfaat bagi proses penyembuhan luka dengan mempercepat regenerasi jaringan.<sup>6</sup>

Biomaterial di bidang kedokteran gigi harus memenuhi persyaratan, yaitu biokompatibilitas yang baik, tidak toksis, non iritan, dan tidak merugikan lingkungan biologis. Evaluasi bahan kedokteran gigi dapat dilakukan dengan uji toksisitas, untuk mengukur efek toksik bahan terhadap sel atau untuk mengetahui apakah bahan tersebut memenuhi syarat untuk diterima dalam jaringan. Efek sitotoksitas suatu bahan diukur dengan melakukan pengukuran terhadap viabilitas sel pada kultur.<sup>7</sup> Kultur sel fibroblas dapat diambil dari jaringan ligamen periodontal manusia. Sedangkan aktivitas proliferasi merupakan salah satu fase dalam penyembuhan luka, yaitu fase dimana matriks fibrin mulai masuk ke daerah luka, stimulasi *growth factor*, ECM, dan angiogenesis dimana sangat berperan dalam proses penyembuhan.

Pada penelitian ini penulis ingin mengetahui aktivitas sitotoksitas dan kemampuan proliferasi ekstrak kulit buah kakao menggunakan *serial dilution* dengan dosis konsentrasi 1.56 ; 3.125; 6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 ; 100, dan 200 µg/ml terhadap kultur sel primer fibroblas ligamen periodontal.

## METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental laboratoris ini telah melalui persetujuan etik no.1128/UN25.8/KEPK/DL/2021 oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fkalutas Kedokteran gigi Universitas Jember.

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel fibroblas ligamen periodontal yang telah dikultur dan dilakukan kriopreservasi, merupakan koleksi dari Laboratorium Kedokteran Molekular CDAST Universitas

Jember. Sel fibroblas dikultur dalam media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), ditambahkan 10 % FBS, 2% penisilin-streptomycin, dan 0.5% *amphotericin*. diinkubasi ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C selama 2 hari. Panen sel dilakukan setelah mencapai 80% konfluen. Identifikasi buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan tipe lindak (*Forastero*) dari PT Perkebunan Nusantara XII Jember. Ekstraksi kulit buah kakao menggunakan metode *Ultrasonic Homogenizer*.

Pada penelitian ini digunakan 2 kelompok kontrol diantaranya kelompok kontrol sel dan kontrol media, serta 8 kelompok perlakuan diantaranya konsentrasi 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, dan 200 µg/ml.

## Uji aktivitas sitotoksik dengan metode MTT

Sel fibroblas didistribusikan dalam 96 sumuran, yang masing-masing berisi sel fibroblas dan media kultur DMEM dengan densitas  $5 \times 10^3$  sel/well 100 µl, setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sel fibroblas diamati di bawah mikroskop *inverted*. Ekstrak kulit buah kakao dengan dosis konsentrasi 1.56 ; 3.125; 6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 ; 100, dan 200 µg/ml dimasukkan dalam setiap sumuran, dengan tiap konsentrasi sebanyak 3 sumuran. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dan ditambahkan larutan MTT (*Microtetrazolium*) sebanyak 100 µl, dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C. Stopper reagent (SDS 10% dalam 0.1 N HCL) ditambahkan untuk menghentikan reaksi MTT dan digetarkan di atas *shaker* selama 1 jam. Data absorbansi dibaca dengan *ELISA reader* pada  $\lambda$  570 nm, dan dinyatakan dalam *optical density* (OD), kemudian hasil dikonversi ke dalam rumus persentase viabilitas sel.<sup>7</sup> Hasil persentase viabilitas sel

dimasukkan dalam regresi linier untuk menghitung  $IC_{50}$ .

% Viabilitas Sel =

$$\frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi media}} \times 100\%$$

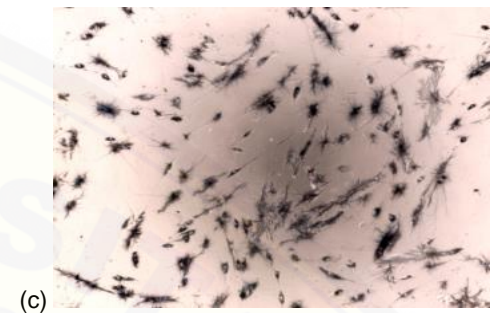
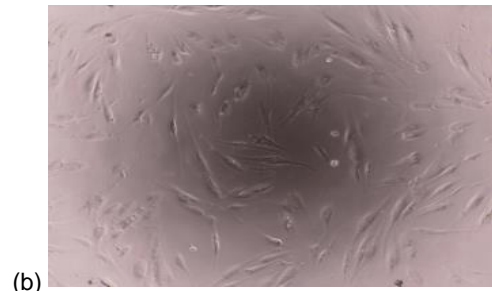
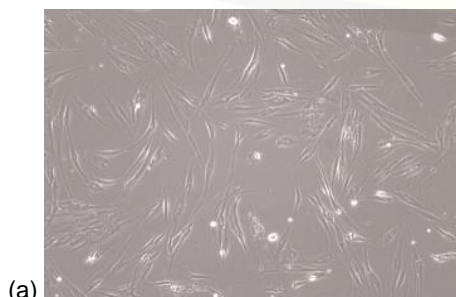
### Uji proliferasi sel (*doubling time*)

Parameter proliferasi sel diuji dengan menghitung viabilitas sel tiap 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Metode MTT juga digunakan dalam uji proliferasi sel. Sel Periodontal Ligamen ditanam pada microplate 96 well dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Medium diganti dan ditambahkan larutan uji berbagai konsentrasi dengan *co-solvent* DMSO, diinkubasi selama 24 jam, setelah itu ditambahkan  $100 \mu\text{L}$  media kultur dan  $10 \mu\text{L}$  MTT  $5 \text{ mg/mL}$  pada tiap sumuran. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%,  $37^\circ\text{C}$ , plate dibungkus dibiarkan selama satu malam. Pengukuran dilakukan pada waktu ke-0, 24, 48, dan 72 jam. Serapan dibaca dengan *microplate reader* (Biorad) pada panjang gelombang 595 nm. Uji proliferasi sel dan viabilitas sel menggunakan metode yang sama, hanya dibedakan pada variasi waktu.<sup>10</sup>

## HASIL PENELITIAN

### Uji aktivitas sitotoksik

Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis, hasil uji MTT dianalisis dari perubahan warna pada *microplate*, serta nilai *optical density* persentase sel yang hidup.



**Gambar 1.** Gambaran morfologi sel fibroblas ligamen periodontal normal sebelum perlakuan dengan *inverted microscope* perbesaran 10x (a). Setelah dilakukan seeding *96-well* dan inkubasi 24 jam (b). Setelah diberi reagen MTT, terdapat kristal formazan yang terbentuk dengan perbesaran 10x menandakan sel fibroblas yang masih hidup (c)

Data hasil OD mengenai sitotoksisitas ekstrak pada dosis konsentrasi 1.56 ; 3.125; 6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 ; 100, dan 200  $\mu\text{g/mL}$  terhadap kultur sel primer fibroblas ligamen periodontal dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Rata-rata nilai OD dan persentase viabilitas sel primer fibroblas ligamen periodontal

Perlakuan ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata OD	Viabilitas sel (%) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )
1.56	0.373	111.48 $\pm$ 0.053
3.125	0.361	107.65 $\pm$ 0.04
6.25	0.358	106.83 $\pm$ 0.009
12.5	0.344	102.38 $\pm$ 0.046
25	0.325	96.59 $\pm$ 0.022
50	0.320	95.14 $\pm$ 0.039
100	0.309	91.52 $\pm$ 0.009
200	0.268	79.01 $\pm$ 0.014
KS	0.336	100 $\pm$ 0.029

Keterangan:

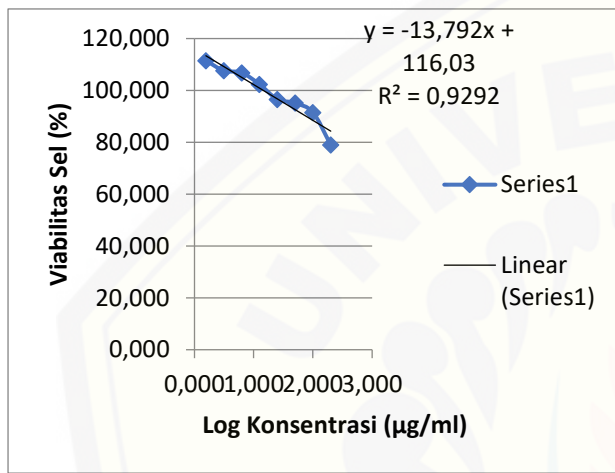
KS : Kontrol Sel

SD : Standar deviasi

Klasifikasi tingkat toksisitas berdasarkan

jumlah sel yang hidup dikelompokkan sebagai berikut: non-toksik (sel yang hidup lebih dari 90%), sedikit toksik (sel yang hidup antara 60% sampai 90%), cukup toksik (sel yang hidup antara 30% sampai 59%), dan sangat toksik (sel yang hidup kurang dari 30%).<sup>8</sup>

Rata-rata persentase viabilitas sel dihitung *inhibition concentration (IC<sub>50</sub>)* menggunakan regresi linier. Hasil penghitungan dapat dilihat pada gambar berikut.



**Gambar 2.** Regresi linier pengaruh konsentrasi ekstrak kulit buah kakao terhadap persentase viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal

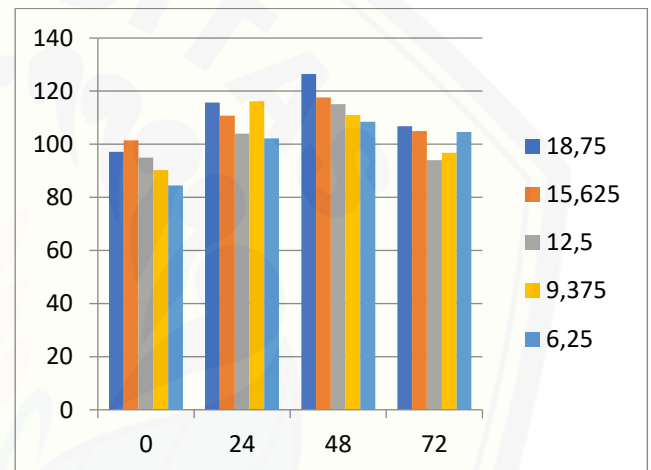
Pada analisis regresi linier diperoleh persamaan yaitu  $y = -13.792x + 116.03$  dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 61313.78 µg/ml. Menurut USA National Cancer Institut menjelaskan bahwa rentan nilai  $IC_{50} \geq 500$  µg/ml tidak toksik.<sup>9</sup> Berdasarkan kriteria tersebut kelompok perlakuan sitotoksisitas terhadap sel fibroblas ligamen periodontal menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak kulit buah kakao dengan pelarut etanol 70% termasuk dalam kategori tidak toksik.

Hasil uji *Kruskall Wallis* menunjukkan nilai signifikansinya sebesar 0.025 ( $p < 0.05$ ) artinya terdapat perbedaan viabilitas sel yang antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Untuk melihat perbedaan yang terjadi antar setiap kelompok dilakukan uji *Mann Whitney* diperoleh pada konsentrasi 6.25 µg/ml didapatkan perbedaan

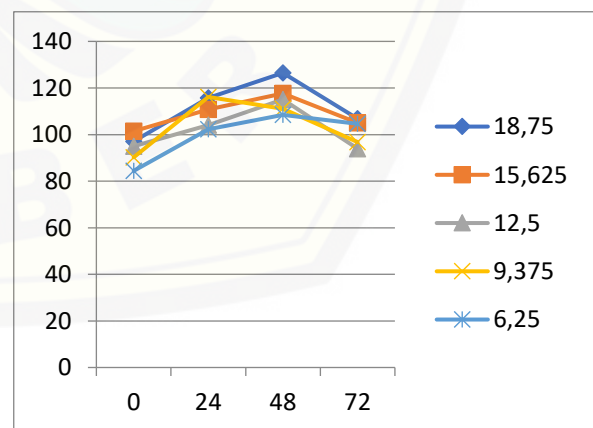
bermakna dengan konsentrasi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 25 µg/ml, serta kontrol media.

### Uji pengamatan proliferasi sel

Hasil uji *doubling time* menunjukkan peningkatan viabilitas sel setelah perlakuan dan inkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan menurun pada 72 jam. Hasil ini terjadi hampir di semua konsentrasi, terutama pada 18.75 µg/ml. Jumlah sel hidup yang menurun pada pada jam ke-72, disebabkan banyak sel yang mati akibat metabolit sel dan jumlah sel terus meningkat sedangkan jumlah nutrisi terus berkurang.



**Gambar 3.** Rata-rata viabilitas sel pada uji proliferasi doubling time 0, 24, 48 dan 72 jam



**Gambar 4.** Kurva kinetika aktivitas proliferasi sel fibroblas PDLSCs yang diinkubasi selama 0, 24, 48, dan 72 jam

## DISKUSI

Metode *MTT* assay merupakan uji yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium yang berwarna kuning menjadi kristal formazan. Intensitas warna dari kristal formazan yang berwarna ungu dibaca menggunakan *ELISA reader*. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk maka semakin tinggi nilai absorbansinya. Semakin tinggi nilai absorbansi maka semakin besar viabilitas selnya.<sup>11</sup>

Persentase sel yang hidup lebih dari 90% (tidak toksik) terdapat pada konsentrasi 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100 µg/ml. Hasil tabel menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah kakao maka menyebabkan penurunan viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal.

Kulit buah kakao pada penelitian ini merupakan biomaterial herbal alternatif yang memiliki manfaat di bidang kesehatan. Kandungan polifenol yang tinggi dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami, antiinflamasi, dan antibakteri.<sup>6</sup> Ekstrak kulit buah kakao yang digunakan dilarutkan menggunakan etanol. Dalam proses ekstraksi, pelarut akan melarutkan bahan yang polaritasnya sejenis. Etanol sebagai pelarut memiliki sifat polar karena memiliki gugus hidroksil (-OH). Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut etanol 70% menunjukkan bahwa kandungan flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid memiliki intensitas positif sangat kuat karena etanol lebih mudah berpenetrasi ke membran sel untuk mengekstrak bahan aktif dari tanaman.<sup>12</sup>

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah kakao, maka semakin rendah nilai absorbansi (*optical density*) yang didapatkan. Hal ini terbukti dari hasil yang didapat, tampak adanya penurunan viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal seiring

dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kulit buah kakao. Pada konsentrasi 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100 µg/ml didapatkan viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal lebih dari 90%.

Menurut Heravi *et al* (2013), suatu bahan diklasifikasikan tidak toksik apabila rata-rata viabilitas selnya lebih dari 90%. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan ke-7 konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini tidak toksik. Sel fibroblas tetap hidup dapat disebabkan karena adanya kandungan flavonoid ekstrak kulit buah kakao yang berperan sebagai antioksidan alami, dan telah dibuktikan menggunakan uji aktivitas antioksidan dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode DPPH, kemudian diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 62 mg/L dan tergolong dalam kategori antioksidan kuat. Pada konsentrasi 200 µg/ml didapatkan viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal 79.01% yang termasuk bersifat toksik. Menurut Heravi *et al* (2013), suatu bahan diklasifikasikan sebagai sedikit toksik apabila rata-rata viabilitas selnya antara 60% sampai 90%. Kenaikan konsentrasi pada ekstrak kulit buah kakao dapat membuat antioksidan senyawa flavonoid berkurang dan akan mengubah sifat flavonoid menjadi prooksidan yang mempengaruhi sel fibroblas ligamen periodontal dengan menyebabkan nekrosis pada sel.<sup>8</sup>

Sebagai senyawa aktif metabolit sekunder, Tanin merupakan turunan polifenol dengan tingkat kepolaran yang tinggi, oleh karena itu bila diberikan dalam konsentrasi tinggi mempunyai kemampuan untuk menyebabkan genotoksik, yaitu rusaknya informasi genetik dalam sel. Adanya ikatan antar senyawa polar dengan lipoprotein sel dapat mengakibatkan terjadinya penimbunan senyawa dan pemecahan lemak, sehingga, permeabilitas sel fibroblas ligamen periodontal akan terganggu menyebabkan sel menjadi bengkak dan pecah.<sup>13</sup>

Pada kulit buah kakao, kandungan saponin memiliki sifat toksisitas yang cukup kuat. Hal tersebut dikaitkan dengan struktur saponin terdapat molekul ampifatik, yaitu molekul yang memiliki regio hidrofobik serta hidrofilik yang dapat melarutkan protein membran. Ujung hidrofobik saponin berikatan dengan regio hidrofobik protein membran sel dan merusak unsur lipid yang terikat. Ujung hidrofilik yang bebas akan membawa protein ke dalam larutan sebagai kompleks deterjen-protein, dan menyebabkan membran sel lisis. Saponin juga memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada kultur sel fibroblas.<sup>14</sup>

Alkaloid dalam kulit buah kakao cukup tinggi yaitu 5.06%. Senyawa ini berperan dalam mempengaruhi kehidupan sel fibroblas ligamen periodontal. Alkaloid bekerja secara spesifik pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Adanya hambatan pembelahan sel tersebut dapat menyebabkan proses proliferasi sel menjadi terhambat. Senyawa alkaloid juga dapat menyebabkan adanya ikatan terhadap tubulin, dengan menghambat polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus. Akibatnya, fungsi tubulin sebagai sitoskeleton (penyusun bentuk/kerangka sel) menjadi terganggu, dan mengakibatkan gangguan transport zat ke dalam sel.<sup>15</sup>

Penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa ekstrak kulit buah kakao pada konsentrasi 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, dan 100 µg/ml tidak memiliki efek toksik terhadap kultur sel primer fibroblas ligamen periodontal. Hal tersebut didukung dengan hasil penelitian sebelumnya, bahwa daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang memiliki kandungan senyawa aktif meliputi flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid pada konsentrasi sampai 125 µg/ml juga bersifat tidak toksik terhadap sel fibroblas. Senyawa yang menyebabkan toksisitas dapat melalui mekanisme yang berbeda, seperti

kerusakan membran sel, pencegahan sintesis protein, penghambatan rantai nukleotida, dan reaksi enzimatik. Selain itu, faktor yang mungkin berperan dalam sitotoksitas bahan adalah waktu pemaparan dan mekanisme toksisitas senyawa tersebut. Kematian sel terjadi apabila terdapat senyawa yang merusak membran sel, sehingga terjadi gangguan pada sel untuk mempertahankan homeostasis, menyebabkan air dan ion ekstraseluler masuk ke dalam sel. organel intraseluler, meliputi mitokondria akan membengkak dan pecah (lisis).<sup>16</sup>

## KESIMPULAN

Uji sitotoksitas ekstrak kulit buah kakao memiliki viabilitas tinggi pada dosis 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, sehingga termasuk kategori tidak toksik. Melalui uji proliferasi pada konsentrasi yang sama juga terbukti meningkatkan proliferasi sel pada 24 dan 48 jam.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didukung oleh LP2M Universitas Jember melalui bantuan dana hibah kelompok riset tahun 2020. .

## DAFTAR PUSTAKA

1. Thantawi A, Nova M M, Marlisa S, Bakar A. *Stomatitis aphthosa rekuren (SAR) minor multiple pre menstruasi (laporan kasus)*. ODONTO: Dental Journal. 2014;1(2):57-62.
2. Ernawati DS. *Ilmu Penyakit Mulut (Oral Medicine) sebagai Jembatan yang Memfasilitasi Ilmu Kedokteran Gigi dan Kedokteran*. Perpustakaan Universitas Airlangga. 2011.
3. Imananta FP, Sulistiyansih S. Artikel Tinjauan: *Penggunaan Nsaids (Non Steroidal Anti Inflammation Drugs) Menginduksi Peningkatan Tekanan Darah Pada Pasien Arthritis*. Farmaka. 2018;16(1):72-79.
4. Hapsari K. *Efektivitas Salep Ekstrak Etanol Daun Kamboja (Plumeria accuminata Ait) terhadap Penyembuhan Luka Gingival Melalui*

- Pengamatan Sel PMN (Polimorfonuklear)*. 2014. Yogyakarta: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Rahayu YC, Dharmayanti AWS, Putri YE, Irmawati A. *The analysis of poanthocyanidins cacao peel extract (Theobroma cacao L) potential of the expression of TNF-a and COX-2 on periodontitis rats*. Intl J Pharmaceutical Res. 2020;12(4):4337-4343.
  - Ackar D, Lendic KV, Valek M et al. *Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food?*. Journal of Chemistry. 2013; Article ID 289392. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/289392>
  - Muslihah K., Sumono A, Fatmawati D W A. *Cytotoxicity effect of pectin extract from coffea robusta (coffea canephora) fruit peels on human dental pulp fibroblasts cell*. Pustaka Kesehatan. 2018;6(1): 173-178.
  - Heravi F, Ramezani M, Poosti M, Hossein Mi, Shajiei A, Ahrari F. *In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nano-particles*. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects. 2013;7(4): 192-198.
  - Hameed-Abdel ESS, Bazaid SA, Shohayeb MM, El-Sayed MM, El Walkil SA. *Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of Conocarpus erectus L. Growing in Taif, Saudi Arabia*. European Journal of Medicinal Plants. 2012;2(2):93-112.
  - Meiyanto E, Susidarti RA, Handayani S, Rahmi F. *Ekstrak etanolik biji buah pinang (Areca catechu L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7*. MFI. 2008; 19(1): 12-19.
  - Hayyu N, Endah A, Djamhari M. *Cytotoxicity of Garcinia mangostana Linn pericarp extract toward human gingival fibroblast cell*. Oral Medicine Dental Journal. 2013;4(1):10-16.
  - Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. & Kaur, H. A review: Phytochemical screening and extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011;1(1):98-106.
  - Yunus R. *Uji Sitotoksitas Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa)*. 2012. Surabaya: Universitas Airlangga.
  - Renawati E. *Sitotoksitas Ekstrak Etanol Aloe vera Terhadap Sel Fibroblas Sebagai Bahan Medikamen Saluran Akar Secara In Vitro*. 2011. Medan: Universitas Sumatra Utara.
  - Fitriani F, Soetojo A, Subiwahjudi A. *Sitotoksitas Ekstrak Kulit Kakao (Theobroma cacao) terhadap Kultur Sel Fibroblas BHK-21*. Conservative Dentistry Journal. 2019;9(1):54-65.
  - Aslantürk ÖS. *In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages*. Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World. IntechOpen Book. 2017;1-18.