

PERBANDINGAN UJI SITOTOKSIK FRAKSI N-HEKSAN, FRAKSI ETIL ASETAT DAN EKSTRAK PURIFIKASI HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Ugrasena, Putu Yudha¹, Puspitasari, Dyah Ratna Ayu², Rupayantini, Dewa Ayu²

¹Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bali Wisnu Dharma Denpasar
Jalan Kebo Iwa 1-2, Denpasar, Bali

² Program Studi D3 Farmasi, Akademi Kesehatan Bintang Persada
Jalan Gatot Subroto Barat 144 A, Denpasar, Bali

e-mail: ugrasenayudha@gmail.com

Received : Februari, 2022

Accepted : Maret, 2022

Published : April, 2022

Abstract

Cancer is a disease caused by abnormal growth of body tissue cells, characterized by uncontrolled cell division. Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) is known to have anti-cancer activity. One of the preliminary test methods used to determine the potential of sambiloto as an anticancer is the acute toxicity test. The acute toxicity test used was the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The purpose of this study was to determine the value of LC50% (Lethal Concentration) as the cytotoxic activity of the n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and purified extract of bitter herbs. The method used is maceration with 96% ethanol followed by fractionation and purification with n-hexane, ethyl acetate, and water as solvents. Cytotoxic activity test with BSLT using concentration variations of 0, 10, 50, 100, 500, 1000 ppm. The results showed cytotoxic activity based on LC50 values for the n-hexane, ethyl acetate, and purified extract fractions, namely 19.9×10^{12} ppm, 5261,5 ppm, and 83,8 ppm. The results showed that the purified extract of sambiloto herb was very toxic with an LC50 value of 1000 ppm, namely 83.799 ppm ($p < 0.01$).

Keywords: *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, BSLT, LC₅₀

Abstrak

Penyakit kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh tidak normal, ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali. Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) dikenal memiliki aktivitas sebagai anti kanker. Salah satu metode uji pendahuluan yang digunakan untuk mengetahui potensi sambiloto sebagai antikanker adalah dengan uji toksisitas akut. Uji toksisitas akut yang digunakan adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai LC50% (Lethal Concentration) sebagai aktivitas sitotoksik dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan ekstrak purifikasi herba sambiloto. Metode yang digunakan yaitu maserasi dengan etanol 96% dilanjutkan dengan fraksinasi dan purifikasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Uji aktivitas sitotoksik dengan BSLT menggunakan variasi konsentrasi 0, 10, 50, 100, 500, 1000 ppm. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas sitotoksik berdasarkan nilai LC₅₀ berturut-turut pada fraksi n-heksan, etil asetat, dan ekstrak purifikasi yaitu $19,97 \times 10^{12}$ ppm, 5261.475 ppm, dan 83.799 ppm. Hasil menunjukkan ekstrak purifikasi herba sambiloto bersifat sangat toksik dengan nilai LC₅₀ ≤ 1000 ppm yaitu 83.799 ppm ($p < 0,01$).

Kata Kunci: *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, BSLT, LC₅₀

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit multifaktor yang dapat disebabkan salah satunya karena radikal bebas. Radikal bebas dapat merusak sel dan dapat mengubah DNA atau menonaktifkan gen yang terlibat dalam proliferasi dan kematian sel. Dengan demikian sel normal dapat berkembang menjadi sel kanker (Putri, et al., 2020).

19,3 juta kasus kanker baru terjadi di seluruh dunia dan hampir 10,0 juta kematian akibat kanker terjadi pada tahun 2020. Beban kanker global diperkirakan menjadi 28,4 juta kasus pada tahun 2040, meningkat 47% dari tahun 2020 (Sung, et al., 2021). Angka kasus kanker baru di Indonesia sebesar 396.914 kasus dengan angka kematian 234.511 per tahun 2020 (Global Cancer Observatory, 2020).

Obat kemoterapi masih dianggap sebagai pengobatan paling utama untuk kanker, namun efek samping yang ditimbulkan sangat besar (Firdaus, et al., 2013). Harga yang relatif mahal dan efek samping yang besar pada pengobatan kanker, mendorong untuk dilakukannya pencarian sumber senyawa baru dari tanaman yang nantinya bisa menjadi pilihan dalam pengobatan (Chanu, et al., 2018 dan Suryati, et al., 2018).

Pemanfaatan tumbuhan alam sebagai alternatif terapi kanker dengan aktivitas antiosid dan sitotoksik tinggi saat ini sudah mulai berkembang salah satunya adalah Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) (Nagaraja, et al., 2016). Sambiloto telah dilaporkan memiliki efek farmakologi sebagai antikanker, antidiare, antih hepatitis, antihiperlipidemia, antiinflamasi, antimalaria, antioksidan, efek pada kardiovaskular, sitotoksik, hepatoprotektor, antipiretik, analgesik, imunomodulator, antioksidan, dan antimikroba (Zou, et al., 2016). Aktivitas antioksidan senyawa polifenol yang terdapat pada sambiloto berkorelasi positif terhadap penurunan risiko kanker. Polifenol memiliki kemampuan untuk menurunkan regulasi oksidatif dan kaskade sinyal inflamasi dengan menghambat faktor transkripsi, seperti faktor NF- κ B dan protein aktivator-1 (AP-1), yang bertanggung jawab untuk ekspresi spesies oksigen reaktif ROS yang diinduksi inflamasi (Radovanović, 2015).

Andrografolid adalah diterpenoid utama paling banyak dan juga merupakan senyawa fitokimia paling aktif pada sambiloto.

Andrografolid terkandung paling banyak di daun (kurang lebih 2,5 - 4,8%) dan paling sedikit pada biji (Hendrata, et al., 2018). Telah dilaporkan kandungan 14-deoksi-12-hidroksiandrografolid, 14-deoksiandrografolid dan 14-deoksi-11,12-dihidroandrografolid, α -amyrin acetate, triacylglycerols, lupeol, α -amyrin, dan β -amyrin dari daun sambiloto. β -sitosterol, stigmasterol, 5,2'-dihidroksi-7,8-dimethoxyflavon, ester trans cinnamate rantai panjang dan ester asam lemak β -sitosteryl dari akar; squalene, poliprenol, lutein, β -sitosterol, monogalactosyl diacylglycerols, lupeol, dan 14-deoxyandrografolid dari batang sambiloto (Tan, et al., 2016 dan Song, et al., 2013).

Beberapa kandungan kimia tersebut memiliki kelarutan berbeda dalam pelarut organik seperti pada n-heksana, etil asetat, dan etanol. Fraksinasi hingga purifikasi dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas sitotoksik optimal pada setiap fraksi. Penggunaan metode fraksinasi hingga memperoleh ekstrak purifikasi sambiloto bertujuan untuk mendapatkan zat aktif utama (andrografolid) dalam kadar yang lebih besar dengan mengeliminasi *zat ballast* menggunakan beberapa jenis pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda (Lindawati, et al., 2014). Penelitian sitotoksik andrografolid pada sambiloto telah dilaporkan, disebutkan ekstrak etanol sambiloto memiliki aktivitas sebagai penghambat proliferasi sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC₅₀ sebesar 81,09 ppm serta terlihat adanya korelasi positif antara pemberian ekstrak etanol sambiloto terhadap persen kematian sel kanker kolon (Laksmiani, et al., 2017). Ekstrak etanol sambiloto di berbagai daerah di Jawa Timur dijelaskan memiliki aktivitas terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC₅₀ 50 μ g/mL-200 μ g/mL dengan metode MTT assay (Laksmiani, et al., 2017). Saat ini telah banyak dilakukan pengembangan senyawa andrografolid murni (purifikasi) dengan melibatkan pemisahan dan pemurnian lebih lanjut. Metode pemisahan menjadi bagian penting untuk identifikasi senyawa bioaktif. Teknik pemurnian/purifikasi telah mengalami perkembangan dalam beberapa tahun terakhir, terutama penggunaan ekstrak sambiloto yang terpurifikasi (Rasul, et al., 2018). Penelitian sambiloto terhadap uji aktivitas sitotoksik lebih banyak pada penggunaan ekstrak etanol, sehingga perlu dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) terhadap ekstrak purifikasi herba

sambiloto dibandingkan dengan fraksi n-heksana dan etil asetat untuk melihat potensi aktivitas sitotoksik yang lebih optimal.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian Laboratorik eksperimental dilakukan di laboratorium bahan alam Prodi S1 Farmasi STIKES Bali Wisnu Dharma Denpasar.

2.1 Alat Dan Bahan

Alat

Timbangan analitik merk *kenko KK-Lab*, cawan porselin, corong kaca merk *pyrex*, waterbath merk *mommert*, rotary evaporator merk *eyela*, beker glass *pyrex*, tabung reaksi *pyrex*, pipet kaca, aquarium.

Bahan

Herba sambiloto, etanol 96%, etanol 70%, larva *Artemia salina* Leach, aquadest, air laut, tween 80, H₂SO₄, FeCl₃, kloroform, HCL, ammonia.

2.2 Ekstraksi dan Fraksinasi Herba Sambiloto

Serbuk herba sambiloto sebanyak 1 Kg dimaserasi dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama 48 jam. Dilakukan remaserasi dan maserat diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian difraksinasi bertahap dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air panas dengan perbandingan yang sama (1:2) diperlakukan sama sampai cucian n-heksan, etil asetat, dan air menjadi bening (Warditani *et al.*, 2014). Residu yang tersisa di uapkan dengan ditambahkan etanol 96% secukupnya kemudian di uapkan di atas penangas air hingga di peroleh hasil purifikasi.

2.3 Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Larva *Artemia salina* Leach. disiapkan dengan menetasakan telur selama 48 jam dalam akuarium berisikan air laut. Sampel ekstrak etanol herba sambiloto dibuat konsentrasi 10, 50, 100, 500, 1000 ppm. Pembuatan dengan cara larutan induk 10.000 ppm dipipet sebanyak 500 µL, 250 µL, 50 µL, 25 µL, dan 5 µL dimasukkan dalam tabung reaksi. Setelah pelarutnya menguap, ke dalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 50 µL tween, 1 mL air laut, 10 ekor larva *Artemia salina* Leach. dan ditambahkan air laut hingga 5 mL. Disiapkan pula kontrol normal tanpa penambahan ekstrak. Setelah 24 jam lakukan pengamatan terhadap kematian larva. Jumlah larva yang mati dicatat lalu lakukan analisis data untuk mencari konsentrasi kematian (LC₅₀).

2.4 Analisis Data

Pengukuran aktivitas antioksidan dianalisis melalui persamaan regresi linear dalam bentuk grafik dan uji toksisitas dinyatakan dengan nilai LC₅₀. Efek toksik diperoleh dari pengamatan dengan menghitung % kematian (*mortalitas*) larva udang pada tiap konsentrasi. Nilai LC₅₀ diperoleh dari anti log x, dimana x merupakan logaritma konsentrasi bahan toksik pada y =50, yaitu nilai probit 50% hewan uji yang didapatkan melalui persamaan regresi linear $y = bx + a$. Dilakukan Uji One-Way Anova dan Uji LSD (*Least Significance Different*) untuk mengetahui perbedaan kelompok masing-masing fraksi.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

Hasil penelitian dilihat dari mortalitas larva *A. salina* Leach. pada setiap tabung uji yang berisi larva dengan 5 mL air laut. Percobaan dilakukan triplo masing-masing variasi konsentrasi pada fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan purifikasi herba sambiloto. Berikut nilai mortalitas dan LC₅₀ ditunjukkan pada tabel :

Tabel 1: Nilai Mortalitas dan LC₅₀ Fraksi N-Heksan, Etil Asetat dan Ekstrak Purifikasi

Fraksi	Konstrasi (ppm)	Total Angka Kematian (replikasi 3 kali)	% Mortalitas	LC ₅₀ (ppm)
N-heksan	0	0	0,5	19,9 x 10 ¹²
	10	0		
	50	0		
	100	1		
	500	0		
Etil asetat	0	0	10,6	5.261,5
	10	0		
	50	0		
	100	3		
	500	4		
Ekstrak purifikasi	0	0	41,1	83,8
	10	5		
	50	9		
	100	12		
	500	21		
1000	25			

Tabel 1. menunjukkan konsentrasi fraksi n-heksana, etil asetat dan ekstrak purifikasi herba sambiloto memberikan aktivitas sitotoksik yang berbeda terhadap kematian larva *A. salina* Leach. Persentase mortalitas tertinggi terdapat pada ekstrak purifikasi herba sambiloto dengan rata-rata 83.33. Fraksi n-heksana menyebabkan kematian pada konsentrasi 100 ppm. Pada fraksi etil asetat kematian pada konsentrasi 100, 500, dan 1000 ppm dengan masing-masing jumlah total larva yang mati yaitu 3,4 dan 12 ekor. Pada ekstrak purifikasi kematian terjadi pada setiap konsentrasi dari 10, 50, 100, 500, 1000 ppm. Dengan jumlah kematian yaitu 5, 12, 9, 21 dan 25 ekor. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi yang diberikan sekali (tunggal) atau beberapa kali dalam 24 jam dari suatu zat yang secara statistik diharapkan dapat mematikan 50% hewan coba. Sehingga dari tabel 1, menunjukkan toksisitas dari ekstrak purifikasi herba sambiloto lebih tinggi dengan nilai 83,8 ppm.

Tabel 2. Uji One-way ANOVA dan LSD Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach.

Perbandingan ekstrak		P-Value One-way ANOVA	P-Value LSD
N-heksana	Etil asetat Purifikasi	<0,05 *	.268
Etil asetat	N-heksana Purifikasi		<0,05*
Purifikasi	N-heksana Etil asetat		<0,05*

Tabel 2. Memperlihatkan perbedaan bermakna mortalitas larva antara fraksi n-heksana, etil asetat dan ekstrak purifikasi herba sambiloto. Hasil uji pada *one-way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($P < 0,05$) dan uji LSD menunjukkan ekstrak purifikasi memiliki aktivitas sitotoksik lebih baik dibandingkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat ($P < 0,05$).

3.2 Pembahasan

Hasil yang diperoleh sering dihubungkan dengan aktivitas sitotoksik yang merupakan syarat utama obat-obat antitumor. Suatu ekstrak dapat dikatakan toksik atau berpotensi sebagai antikanker apabila memiliki nilai LC_{50} (konsentrasi yang mampu membunuh 50%) kurang dari 1000 ppm setelah waktu kontak 24

jam (Yunus, et al., 2018). Tabel 1 diatas terlihat bahwa fraksi n-heksan tidak mempengaruhi kematian larva dengan baik, konsentrasi yang mempengaruhi kematian larva hanya pada konsentrasi 100 ppm, hal tersebut diakibatkan migrasi kadnungan kimia potensi seperti andrografolid pada fraksi etil dan pada fraksi purifikasi, sehingga kematian kecil pada fraksi n-heksana. Sedangkan pada fraksi etil asetat dan ekstrak purifikasi mempengaruhi kematian larva pada setiap konsentrasi dengan peningkatan kematian sesuai dengan peningkatan konsentrasi yang ada. Dapat disimpulkan bahwa hasil purifikasi lebih toksik dibandingkan dengan fraksi h-heksana dan fraksi etil asetat karena ekstrak purifikasi herba sambiloto memiliki nilai toksisitas ≤ 1000 ppm yaitu 83.799 ppm. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksan, etil asetat, dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan n-heksan, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar.

Dari proses ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga. Ekstraksi senyawa yang terkandung di daun sambiloto dengan menggunakan etanol akan melarutkan klorofil, senyawa andrografolid dan turunannya serta senyawa lainnya. N-heksana akan lebih menarik klorofil dan kecenderungan senyawa non polar lainnya. Penggunaan etil asetat untuk menarik senyawa lainnya selain diterpen lakton seperti flavonoid, andrografolid lebih cenderung larut pada pelarut semi polar seperti etanol dan kloroform. Pencucian dengan air tidak bisa menarik andrografolid sehingga ditujukan untuk menarik senyawa lainnya yang memiliki indkes polaritas tinggi (Srijanto, et al., 2012 dan Rais, et al., 2014). Oleh karenanya dari uji sitotoksik pada tabel 1 menunjukkan ekstrak purifikasi lebih baik dan berbeda bermakna ($P < 0,05$) dibandingkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dibandingkan dengan fraksi n-heksana memiliki aktivitas yang lebih baik dikarenakan senyawa andrografolid beserta turunannya larut lebih baik pada etil asetat dibandingkan n-heksana (Lidawati, et al., 2014).

Beberapa penelitian terkait aktivitas sitotoksik andrografolid pada sambiloto pada fraksi etil asetat sambiloto dengan kandungan andrografolid 32,13% terhadap sel kanker payudara menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki nilai IC50 sebesar 14,32 bpj untuk sel MCF7 dan 17,66 bpj untuk sel T47D [19]. Keberadaan senyawa pengotor yang lebih banyak merugikan kestabilan dan mengurangi kadar senyawa aktif di dalam ekstrak sehingga harus dihilangkan. Fraksinasi dan Purifikasi ekstrak diharapkan akan meningkatkan khasiat ekstrak dengan meningkatkan komponen kimia utama dan mayor dari suatu tanaman obat disamping memperkecil jumlah dosis pemberian kepada pengguna (Srijanto, et al., 2012) (Warditiani, et al., 2016) (Nugroho, et al., 2012).

Mekanisme kerja andrografolida sebagai anti kanker, anti inflamasi maupun anti dislipidemia sangat berkaitan dengan mekanisme kerja senyawa ini sebagai antioksidan. Struktur γ -laktone tidak jenuh pada C13 dan C14 dari andrografolida dapat menetralkan anion superoksida. Ikatan rangkap pada grup ester karbonil ini akan mempengaruhi deprotonisasi atom H yang terletak pada C15 sehingga atom H pada C15 akan mudah diekstraksi oleh anion superoksida yang sangat reaktif. Dengan demikian, andrografolida dapat menghentikan reaksi berantai dari suatu molekul radikal. Mekanisme tersebut dapat menyebabkan senyawa andrografolida berperan dalam mengurangi efek radikal bebas pada berbagai penyakit (Yunita, et al., 2021).

4. KESIMPULAN

Uji sitotoksik dengan metode BSLT menunjukkan nilai LC₅₀ berturut-turut pada fraksi n-heksan, etil asetat, dan purifikasi yaitu 19,97x10¹² ppm, 5.261,5 ppm, dan 83,8 ppm. Nilai LC₅₀ tertinggi adalah 83.799 ppm (P<0,01) pada ekstrak purifikasi herba sambiloto. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak purifikasi herba sambiloto bersifat sangat toksik terhadap larva *A. salina Leach*.

DAFTAR PUSTAKA

A. E. Nugroho, M. Andrie, N. K. Warditiani, E. Siswanto, S. Pramono, and E. Lukitaningsih, "Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f.)

Nees and andrographolide in high-fructose-fat-fed rats," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 44, no. 3, pp. 377–381, 2012, doi: 10.4103/0253-7613.96343.

- A. P. Hendrata, K. Handono, H. Kalim, and L. E. Fitri, "Andrographis paniculata can modulate the ratio of Treg to Th17 cells in atherosclerotic rats," *Clin. Nutr. Exp.*, vol. 20, pp. 20–29, 2018, doi: 10.1016/j.clnex.2018.05.002.
- Ana Radovanović, "EVALUATION OF POTENTIAL CYTOTOXIC EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS," *Ser J Exp Clin Res*, vol. 16, no. 4, pp. 333–342, 2015, doi: 10.1515/SJECR.
- B. Srijanto, O. B. P, L. Khojayanti, E. Rismana, and Sriningsih, "Pemurnian Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness.) Dengan Teknik Ekstraksi Cair-Cair," *Prosiding inSINas*, pp. 26–29, 2012
- E. Yunita, "Mekanisme Kerja Andrografolida Dari Sambiloto Sebagai Senyawa Antioksidan," *Herb-Medicine J.*, vol. 4, no. 1, p. 43, 2021, doi: 10.30595/hmj.v4i1.8825.
- G. T. Putri, S. Susianti, S. Bakri, B. Kurniawan, M. Muhartono, and S. Sutyarso, "Identification of Anti-cancer Compounds and Cytotoxic Effects on HeLa Cervical Cancer Cells from *Cyperus rotundus* L. Growing in Tanggamus, Lampung, Indonesia.," pp. 2–8.
- H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- I. R. Rais, "EKSTRAKSI ANDROGRAFOLID DARI (Burm.f.) Nees MENGGUNAKAN EKSTRAKTOR SOXHLET," *Pharmaciana*, vol. 4, no. 1, 2014, doi: 10.12928/pharmaciana.v4i1.402.
- I. Yunus, W. Boddhi, and E. De Queljoe, "Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Langsung (*Lansium Domesticum* Corr) Terhadap Larva *Artemia Salina Leach* Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt)," *Pharmaccon*, vol. 7, no. 3, pp. 89–96, 2018, doi: 10.35799/pha.7.2018.20449
- K. Victoria Chanu *et al.*, "Phytochemical analysis and evaluation of anticancer activity of *Parkia javanica* seeds," ~ 305

- ~ *Pharma Innov. J.*, vol. 7, no. 5, pp. 305–311, 2018, [Online]. Available: www.thepharmajournal.com.
- M. C. S. Tan, G. G. Oyong, C. C. Shen, and C. Y. Ragasa, "Chemical composition of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) nees," *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, vol. 7, no. 6, pp. 2405–2408, 2016.
- M. Firdaus, A. A. Prihanto, and R. Nurdiani, "Antioxidant and cytotoxic activity of *Acanthus ilicifolius* flower," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 3, no. 1, pp. 17–21, 2013, doi: 10.1016/S2221-1691(13)60017-9.
- M. G. Rasul, "Extraction, Isolation and Characterization of Natural Products from Medicinal Plants," *Int. J. Basic Sci. Appl. Comput.*, vol. 2, no. 6, 2018.
- N. K. Warditiani *et al.*, "Antiatherosclerosis effect of purified andrographis paniculata extract," *Int. J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 457–460, 2016.
- N. P. L. Laksmiani, N. M. W. Astuti, N.K.Warditiani, and I.M.A.G.Wirasuta, "AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness .) PADA SEL KANKER KOLON WiDr," *Semin. Nas. Sains dan Teknol.*, vol. 73, no. 5, pp. 14–15, 2017.
- N. Y. Lindawati, A. E. Nugroho, and S. Pramono, "THE EFFECT OF COMBINATION FROM PURIFIED EXTRACT OF SAMBILOTO HERB (*Andrographis paniculata* (Burm . f .) Nees) AND PEGAGAN HERB (*Centella asiatica* (L .) Urban) OF TRANSLOCATION OF GLUT-4 PROTEIN IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS-INSULIN RESISTANCE RATS," *Trad. Med. J.*, vol. 19, no. May, pp. 62–69, 2014.
- S. S. Surini Wahono; Rosidah, Idah, "STANDARDISASI FRAKSI ETIL ASETAT HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees)," *J. Bahan Alam Indones.*, no. Vol 8, No 1 (2012), 2012, [Online]. Available: <http://jbai.iregway.com/index.php/jurnal/article/view/229>.
- Suryati, E. Husni, W. Astuti, and N. Ranura, "Karakterisasi dan Uji Sitotoksik Daun Jeruju (*Acanthus illicifolius*)," *J. Sains Farm. Klin.*, vol. 5, no. 3, pp. 207–211, 2018.
- The Global Cancer Observatory, "Cancer Incident in Indonesia," *Int. Agency Res. Cancer*, vol. 858, pp. 1–2, 2020, [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/>.
- W. Zou *et al.*, "The anti-inflammatory effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees on pelvic inflammatory disease in rats through down-regulation of the NF-KB pathway," *BMC Complement. Altem. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1466-5.
- Y. P. Nagaraja and V. Krishna, "Hepatoprotective effect of the Aqueous Extract and 5-Hydroxy, 7,8,2' Trimethoxy Flavone of *Andrographis alata* Nees. in Carbon Tetrachloride Treated Rats," *Achiev. Life Sci.*, vol. 7, pp. 1–6, 2016.
- Y. X. Song, S. P. Liu, Z. Jin, J. F. Qin, and Z. Y. Jiang, "Qualitative and quantitative analysis of *Andrographis paniculata* by rapid resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry," *Molecules*, vol. 18, no. 10, pp. 12192–12207, 2013, doi: 10.3390/molecules181012192.