



Toxicity and anticancer analysis of *Hibiscus surattensis* L. leaf extract

Yuliet^{1*}, Lusi Lestari², Donna M. Putri², Khildah Khaerati¹, Ihwan¹

¹Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Tadulako University, Palu-94118, Central Sulawesi, Indonesia

²Laboratory of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Tadulako University, Palu-94118, Central Sulawesi, Indonesia

Submitted 24 August 2022; Revised 17 February 2024; Accepted 5 March 2024; Published 28 October 2024

*Corresponding author: yuliet_susanto@yahoo.com

Abstract

The leaves of *Hibiscus surattensis* L. have been traditionally utilized in medicinal practices for a long time. Several reports have shown potential therapeutic effects, including antidiabetic, antibacterial, antidiarrheal, analgesic, hepatoprotective, and antioxidant. The *Hibiscus surattensis* L. plant also has anti-cancer potential because of its secondary metabolite content, especially polyphenols and flavonoids. However, there has been no research regarding its toxicity and potential as an anti-cancer. Hence, this research aims to evaluate the toxic effects of *Hibiscus surattensis* L. (HSL) leaf extract through the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The in vitro anticancer method uses MCF-7 and HeLa cells with the Presto Blue assay. The HSL extract was obtained through maceration using 96% ethanol. The BSLT results indicated that HSL has an LC₅₀ value of 224.81 µg/mL. The Presto Blue test showed an IC₅₀ value of 1419.83 µg/mL for HSL extract in MCF-7 cells and 2050.50 µg/mL in HeLa cells. Based on the analyzed LC₅₀ value of less than 1000 µg/mL, it can be concluded that the extract is toxic. However, the cytotoxicity results from the Presto Blue test revealed that the HSL extract does not exhibit cytotoxic activity against HeLa and MCF-7.

Keywords: BSLT, cytotoxicity, HeLa, MCF-7, toxicity

Analisis Toksisitas dan Antikanker Ekstrak Daun *Hibiscus surattensis* L.

Abstrak

Daun *Hibiscus surattensis* L. telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional. Beberapa laporan sebelumnya menunjukkan beberapa potensi efek terapeutik, antara lain antidiabetik, antibakteri, antidiare, analgesik, hepatoprotektif, dan antioksidan. Tanaman *Hibiscus surattensis* L. juga memiliki potensi anti kanker karena kandungan metabolit sekundernya, terutama polifenol dan flavonoid. Namun, belum ada penelitian mengenai toksisitas dan potensinya sebagai anti kanker. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek toksisitas ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. (HSL) menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pengujian anti kanker in vitro dilakukan pada sel MCF-7 dan sel HeLa menggunakan uji Presto Blue. Ekstrak HSL diperoleh melalui proses maserasi dengan etanol 96%. Hasil BSLT menunjukkan bahwa HSL memiliki nilai LC₅₀ sebesar 224,81 µg/mL. Uji Presto Blue menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ ekstrak HSL pada sel MCF-7 adalah 1419,83 µg/mL, dan pada sel HeLa adalah 2050,50 µg/mL. Berdasarkan analisis nilai LC₅₀ yang kurang dari 1000 µg/mL, ekstrak HSL dapat dianggap bersifat toksik. Namun, uji sitotoksik menggunakan uji Presto Blue mengindikasikan bahwa ekstrak HSL tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan MCF-7.

Kata Kunci: BSLT, sitotoksik, HeLa, MCF-7, toksisitas

1. Pendahuluan

Tanaman *Hibiscus surattensis* L. dari suku *Malvaceae* merupakan salah satu tanaman yang telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional, terutama di benua Asia dan Afrika.¹ Tumbuhan ini juga dapat ditemukan di beberapa propinsi di Indonesia seperti Jawa Barat, Riau, Bengkulu, Jambi, Kalimantan Tengah, dan Sulawesi Tengah.² Namun pemanfaatannya sebagai obat tradisional di Indonesia masih terbatas karena dianggap sebagai tumbuhan liar. Efek farmakologi tanaman *Hibiscus surattensis* L. antara lain antidiabetes³, analgesik, antiinflamasi, antidiare, antioksidan⁴, antibakteri⁵, antimalaria⁶ dan hepatoprotektif.¹

Hasil penelitian sebelumnya membuktikan adanya komponen metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid (kaempferol, kuersetin, morin, dan trifolin), tanin, serta triterpenoid pada ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L.⁷ Beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa golongan fenolik dan flavonoid memiliki aktivitas antikanker.⁸ Ekstrak daun *H. surattensis* L. juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat. Aktivitas antioksidan sangat erat kaitannya dengan aktivitas antikanker. Salah satu faktor yang memicu terjadinya kanker adalah stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi ketika terdapat ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas, seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS), yang berasal dari reaksi endogen maupun eksogen, dengan kemampuan antioksidan tubuh. Radikal bebas ini dapat merusak sel, sehingga diperlukan tambahan antioksidan dari makanan atau sumber lain untuk membantu mengatasi kerusakan tersebut. Dengan demikian, dengan mengurangi radikal bebas dan stres oksidatif, antioksidan berperan dalam memperbaiki kerusakan DNA, mengurangi laju pembelahan sel abnormal, dan menurunkan mutagenesis.⁹ Oleh karena itu, banyak tanaman kaya antioksidan yang memiliki aktivitas antikanker.

Penelitian mengenai potensi antikanker ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, dalam

penelitian ini, metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) digunakan untuk menguji toksisitas serta uji sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 (sel kanker payudara) dan HeLa (sel kanker serviks). Penyakit kanker serviks dan payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia¹⁰ termasuk juga di Propinsi Sulawesi Tengah.^{11,12} Kemoterapi adalah metode pengobatan kanker yang efektif. Obat sitotoksik yang digunakan dalam kemoterapi membunuh sel kanker, tetapi juga menyebabkan efek samping dan resistensi. Oleh karena itu eksplorasi bahan alam yang potensial sebagai agen anti kanker yang efektif, selektif dan tidak menimbulkan efek samping terus dilakukan, salah satunya dengan menggunakan tumbuhan *Hibiscus surattensis* L.

Skrining awal untuk mendeteksi toksisitas suatu senyawa dilakukan menggunakan metode BSLT dengan memanfaatkan larva udang *Artemia salina* Leach.¹³ Pengujian ini merupakan salah satu skrining pendahuluan terhadap zat bioaktif yang diprediksi berkhasiat sebagai antikanker. Aktivitas toksisitas dapat diukur berdasarkan tingkat kematian larva pada konsentrasi tertentu, yang dinyatakan melalui nilai LC_{50} . Efek sitotoksik terhadap sel kanker dievaluasi menggunakan metode Presto Blue assay.¹⁴ Uji sitotoksik digunakan untuk mengidentifikasi potensi antikanker dari suatu ekstrak atau senyawa, yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 50% sel hidup.¹⁵

2. Metode

2.1. Alat

Laminar Air Flow (LAF), mikroskop (Olympus), labu kultur sel (Nunc), shaker, vortex, tube Eppendorf, Multimode Reader, incubator CO₂, hemositometer, rotavapor, aluminium foil (Klin Pak), alat-alat gelas, flakon, timbangan analitik, tabung konikal (Nunc), 96 well-plate (Iwaki), mikropipet, yellow tip dan blue tip.

2.2. Bahan

Daun *Hibiscus surattensis* L.,

Sindue Tobata, yang digunakan diperoleh dari desa Alindau Kabupaten Donggala-Sulawesi Tengah yang telah diidentifikasi di Laboratorium Biosistemika Tumbuhan, Jurusan Biologi-FMIPA Universitas Tadulako dengan No.45 8/UN28.1.28/BIO/2021. Etanol 96% teknis, aquadest (Bratachem), telur A. salina (Supreme Plus), sel MCF-7 dan HeLa (Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran). DMSO (Dimetil Sulfoksida), Cisplatin, *Fetal Bovine Serum* (FBS), Trypsin EDTA dan Trypan Blue diperoleh dari Sigma. Pelat KLT F254 (Merck). Antibiotik (Penisilin dan Streptomisin), Phosphate buffered saline (PBS), dan PrestoBlue™ Cell Viability Reagent diperoleh dari Thermo Fischer Scientific sedangkan Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) diperoleh dari Gibco Thermo.

2.3. Prosedur

2.3.1. Pembuatan ekstrak etanol daun

Hibiscus surattensis L.

Ekstrak dibuat menggunakan metode maserasi, yaitu dengan menambahkan 8 liter pelarut etanol 96% ke dalam wadah maserasi yang berisi 700 g serbuk simplisia daun *Hibiscus surattensis* L. Kemudian direndam selama 5 hari dan dilakukan pengadukan sebanyak 1x24 jam untuk homogenisasi serbuk simplisia dengan pelarut etanol. Ekstraksi ini dilakukan 5 kali, setiap pengulangan dilakukan penyaringan untuk memisahkan maserat dan residunya. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan ekstrak cair. Ekstrak cair dievaporasi dengan alat rotavapor pada suhu 50-60°C dengan kecepatan putaran 80 rpm sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup rapat.

2.3.2. Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach (BSLT)

Penyiapan larva udang dilakukan dengan cara menetasakan telur *Artemia salina* Leach selama 48 jam. Pembuatan air laut dilakukan dengan melarutkan 37 gram garam tidak beriodium ditambahkan akuades hingga 1 liter dan diukur pH air laut buatan

hingga mencapai pH 8.0. Dibuat larutan uji 10.000 µg/mL dengan pelarut DMSO 1% kemudian dilakukan pengenceran hingga diperoleh 8 konsentrasi yaitu 25; 50; 100; 150; 300; 500; 750; dan 1.000 µg/mL. Selanjutnya dimasukkan 10 larva dalam botol vial, ditambahkan 1 mL air laut buatan lalu dimasukkan setiap konsentrasi sesuai dengan volumenya masing-masing kemudian dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan air laut buatan dan ditambahkan satu tetes suspensi ragi yang dibuat dengan konsentrasi 0,06%. Setiap konsentrasi diuji dengan 4 kali replikasi. Jumlah larva yang masih hidup dihitung setelah 24 jam.

2.3.3. Uji sitotoksik pada sel MCF-7 dan HeLa

Sel kanker payudara MCF-7 dan sel serviks HeLa didapatkan dari koleksi Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Bandung-Indonesia. Sel-sel ditumbuhkan dalam media kultur cair Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) yang lengkap, mengandung 10% Fetal Bovine Serum (FBS) dan 50 µL antibiotik/50 mL media (100 U/ml penisilin dan 100 U/ml streptomisin). Sebagai kontrol positif, digunakan Cisplatin, sementara kontrol negatif terdiri dari pelarut DMSO 2%, kontrol media, serta kontrol media+sel. Sampel dibuat dengan variasi konsentrasi 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 µg/mL, dengan masing-masing konsentrasi dilakukan dua kali replikasi. Untuk uji kelangsungan hidup sel, digunakan PrestoBlue™ Cell Viability Reagent.

Sel ditumbuhkan hingga mencapai minimal 70% konflisiensi, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Sampel dengan berbagai konsentrasi dan kontrol positif Cisplatin (19 µM untuk uji sel HeLa dan 53 µM untuk uji sel MCF-7) diambil sebanyak 100 µL menggunakan mikropipet, lalu dipindahkan ke dalam well yang sesuai pada 96 well plate yang telah berisi sel. Setelah itu, sel diinkubasi kembali selama 48 jam.

Media lama pada setiap well kemudian dibuang dan diganti dengan 100 µL campuran

media baru (9 mL media ditambah 1 mL PrestoBlue™ Cell Viability Reagent dengan rasio 1:9). Setelah itu, diinkubasi kembali selama 1-2 jam hingga terjadi perubahan warna. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 570 nm dan 600 nm menggunakan multimode reader.¹⁶

2.4. Analisis Hasil

Pada pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT, data diperoleh dari pengamatan dengan menghitung persentase (%) kematian larva uji pada setiap konsentrasi. Jumlah larva uji yang mati dalam setiap vial selama 24 jam dihitung. Persentase kematian dihitung dengan mengalikan rasio larva yang mati terhadap jumlah total larva uji dengan 100%. Perhitungan ini dilakukan untuk setiap replikasi, kemudian nilai LC₅₀ dihitung berdasarkan data yang diperoleh.

$$\% \text{kematian} = \frac{\text{Jumlah larva uji yang mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100$$

(Persamaan 1)

Untuk menentukan potensi toksisitas dihitung LC₅₀ dengan analisis probit. Analisis probit dianalisis menggunakan program SPSS (*Software Package Used for Statistical Analysis*) 26.0 pada tingkat kepercayaan 95%.

Pada pengujian sitotoksik dengan metode PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 570 nm dan 600 nm. Perhitungan nilai absorbansi pada konsentrasi tertentu: $y = (a-b) \cdot X$ (Persamaan 2)

Keterangan:

y (*corrected absorbance*) = nilai absor-

bansi kurva linear pada konsentrasi tertentu
 a = absorbansi sampel pada konsentrasi tertentu pada panjang gelombang 570 nm
 b = absorbansi sampel pada konsentrasi tertentu pada panjang gelombang 600 nm
 X = rerata absorbansi sel + media
 Selanjutnya untuk perhitungan IC₅₀, sebelumnya dibuat kurva regresi linear yang diperoleh dari kurva konsentrasi berbanding *corrected absorbance* sehingga diperoleh persamaan $y = ax + b$ dimana:

y = nilai rerata *corrected absorbance* media + pelarut dibagi 2
 x = nilai konsentrasi IC₅₀

3. Hasil

Pada penelitian ini ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. diperoleh dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% dan diperoleh rendemen sebesar 20,35%. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dilakukan pengujian toksisitas dengan metode BSLT sebagai skrining awal. Hasil ujitoksitas dapat dilihat pada Tabel 1.

Kriteria toksisitas pada BSLT menurut Meyer yaitu apabila nilai LC₅₀ ≤ 1000 µg/mL dinyatakan toksik dan LC₅₀ > 1000 µg/mL tidak toksik¹⁷ sedangkan kriteria toksisitas menurut Clarkson pada ekstrak tumbuhan diklasifikasikan ekstrak dengan LC₅₀ dari 500-1000 µg/mL toksisitas rendah, ekstrak dengan LC₅₀ dari 100-500 µg/mL toksik dan ekstrak dengan LC₅₀ dari 0-100 µg/mL sangat toksik.¹⁸ Hasil BSLT yang dilakukan terhadap sampel uji diperoleh nilai LC₅₀ yang dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan kriteria toksisitas tersebut ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L.

Tabel 1. Hasil pengujian toksisitas BSLT terhadap ekstrak etanol daun *Hibiscus surattensis* L.

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi	Rata-rata Kematian	% Kematian	LC50 (µg/mL)
Ekstrak etanol	25	1,3979	0	0	224,81
	50	1,6989	0	0	
	100	2	1	10	
	150	2,1760	1,25	13	
	300	2,4771	8,25	83	
	500	2,6989	9	90	
	750	2,8750	9,75	98	
	1000	3	10	100	

Tabel 2. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun *Hibiscus surattensis* L. pada sel MCF-7 dan HeLa

Sampel		IC ₅₀
	Sel MCF-7	Sel HeLa
Ekstrak etanol	1419,83 µg/mL	2050,50 µg/mL

tergolong toksik. Uji toksisitas dengan BSLT telah terbukti memiliki korelasi positif dengan aktivitas sitotoksik pada beberapa sel tumor atau kanker. Namun memiliki keterbatasan karena sensitivitasnya yang lemah yang tidak dapat membedakan potensi antikanker yang kuat, sedang dan lemah sehingga metode BSLT digunakan untuk skrining awal untuk mengetahui potensi sitotoksik. Pengujian yang lebih sensitive memerlukan pengujian sitotoksik dengan menggunakan sel kanker manusia.¹⁹

Selanjutnya, dilakukan uji sitotoksik menggunakan sel kanker. Penelitian ini melibatkan sel kanker payudara (MCF-7) dan sel kanker serviks (HeLa).

Pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. memiliki kemampuan penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 dan sel HeLa yang termasuk dalam kategori kurang aktif, karena nilai IC₅₀ lebih dari 500 µg/mL. Berdasarkan kategori aktivitas sitotoksik suatu ekstrak terhadap sel kanker, ekstrak dikatakan sangat aktif jika nilai IC₅₀ < 10 µg/mL, aktif pada IC₅₀ 10-100 µg/mL, cukup aktif pada IC₅₀ 100-500 µg/mL, dan kurang aktif apabila IC₅₀ > 500 µg/mL.²⁰ Cisplatin, yang digunakan sebagai kontrol positif, memiliki nilai IC₅₀ sebesar 5,7 µg/mL, menunjukkan aktivitas yang sangat aktif. Senyawa dengan nilai IC₅₀ di bawah 100 µg/mL dianggap sebagai agen sitotoksik yang poten, sedangkan senyawa dengan nilai IC₅₀ di atas 100 µg/mL dikategorikan sebagai agen kemopreventif yang poten.²¹ Berdasarkan nilai tersebut kriteria IC₅₀ ekstrak daun HSL tidak menunjukkan aktivitas yang poten terhadap sel HeLa dan MCF-7 namun kemungkinan memiliki efek kemopreventif.

4. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi toksisitas ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. menggunakan metode BSLT serta uji sitotoksik pada sel kanker,

yaitu sel MCF-7 dan sel HeLa. Pengujian sitotoksik merupakan parameter awal untuk menilai potensi toksisitas suatu bahan uji, dan terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas sitotoksik senyawa antikanker.

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah teknik skrining yang digunakan untuk menentukan toksisitas akut suatu senyawa atau bahan alami yang memiliki sifat sitotoksik, dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Jika suatu ekstrak tanaman menunjukkan sifat toksik berdasarkan nilai LC₅₀ dari metode BSLT, tanaman tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Namun, jika tidak bersifat toksik, tanaman tersebut dapat diteliti lebih lanjut untuk mengeksplorasi khasiat lain dengan menggunakan hewan uji yang lebih besar, seperti mencit dan tikus, melalui uji *in vivo*.^{22,23}

Larva *A. salina* Leach yang digunakan dalam penelitian ini berada pada fase pertumbuhan nauplius, dimana *Artemia* sedang aktif mengalami pembelahan mitosis, mirip dengan pembelahan sel kanker. Oleh karena itu, uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sering digunakan sebagai penelitian awal untuk menilai potensi aktivitas antikanker. Hasil uji BSLT menunjukkan bahwa ekstrak *Hibiscus surattensis* L. (HSL) tergolong toksik.

Uji sitotoksik *in vitro* pada kultur sel digunakan untuk menilai potensi sitotoksik ekstrak sebagai antikanker. Pengujian ini dilanjutkan dengan menggunakan sel kanker MCF-7 dan sel HeLa. Metode yang digunakan adalah *Presto Blue assay*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak *Hibiscus surattensis* L. (HSL) tidak aktif terhadap sel MCF-7 dan HeLa. Efektivitas Cisplatin sebagai kontrol positif dalam penelitian ini lebih unggul, karena obat antikanker sintesis tersebut telah lama digunakan sebagai terapi adjuvan

untuk kanker serviks dan kanker payudara. Meskipun efek sitotoksik ekstrak HSL tergolong rendah, pengembangan lebih lanjut masih diperlukan, seperti fraksinasi dan purifikasi senyawa aktif untuk meningkatkan potensi sitotoksiknya, terutama pada sel HeLa dan MCF-7. Selain itu, ekstrak HSL dapat dipertimbangkan sebagai agen kemopreventif dalam pencegahan dan penghambatan kanker. Beberapa mekanisme kerja kemopreventif meliputi penghambatan aktivitas karsinogen, aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan antiproliferasi.²⁴ Pada ekstrak HSL diduga efek kemopreventif berhubungan dengan aktivitas antioksidannya. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak HSL7. Senyawa antioksidan dapat melindungi kerusakan DNA yang diinduksi ROS, sehingga mencegah mutagenesis dan inisiasi karsinogenesis.²⁵

Keterbatasan penelitian ini adalah belum melakukan pengujian pada sel normal sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan indeks selektivitas sehingga penelitiannya selanjutnya dapat dilakukan fraksinasi dan isolasi zat aktif dan menggunakan sel normal serta pengujian pada sel kanker lainnya.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak HSL memiliki efek yang toksik pada BSLT namun tidak memiliki efek sitotoksik pada sel MCF-7 dan sel HeLa.

Referensi

1. Anoop JL, Kannappan N, Manojkumar P. Evaluation of hepatoprotective activity in methanolic extract of aerial parts of *Hibiscus surattensis*. *Res J Pharm Tech*. 2020;13(10):4635-40.
2. Harini MS, Ervial AMZ, Ellyn KD. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia: (Etnofitomedika I)*. editor. Indonesia: Yayasan Pustaka Obor Indonesia; 2000.
3. Yuliet, Sukandar EY, Atik N, Adnyana IK. Insulin secretion and repairing pancreatic tissue damage on diabetic mice treated with the extract and active fraction of *Hibiscus surattensis* L. Leaves. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2021;9(4):454-64.
4. Sultana S, Al Faruq A, Nahid-Al-Rashid, Nasim T, Ahsan MQ. In-vitro anti-inflammatory, anti-oxidant and in-vivo analgesic, antidiarrheal activities of fractional leaf extracts of *Hibiscus surattensis*. *Eur J Pharm Med Res*. 2018;5(4):167-73.
5. Akarca G. Composition and antibacterial effect on food borne pathogens of *Hibiscus surattensis* L. calyces essential oil. *Ind Crops Prod*. 2019;137(December 2018):285-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.043>
6. Tiko G, Medjigbodo A, Adamou R, Amoussa AM, Djoghenou L, Lagnika L. Scientific baseline information for the potential use of *Hibiscus surattensis* L against malaria: Phytochemistry and biological Studies. *J Drug Deliv Ther*. 2020;10(5-s):127-35.
7. Yuliet, Sukandar EY, Adnyana IK. Active subfractions, phytochemical constituents, dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity and antioxidant of leaf extract from *Hibiscus surattensis* L. *Nat Prod J*. 2020;10(4):400-10.
8. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):1-25.
9. Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Al Hroust A, Al Sakka R, El-Awady R, Ashraf SS, et al. Antioxidant and anticancer activities of *Trigonella foenum-graecum*, *Cassia acutifolia* and *Rhazya stricta*. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):1-12.
10. Gondhowiardjo S, Christina N, Ganapati NPD, Hawariy S, Radityamurti F, Jayalie VF, et al. Five-year cancer epidemiology at the National Referral Hospital: Hospital-based cancer registry data in Indonesia. *JCO Glob Oncol*. 2021;5(7):190-203.
11. Tempali SR. Analisis hubungan pengetahuan tentang deteksi dini kanker payudara pada remaja putri melalui pemeriksaan payudara klinis (Sadanis) di Akbid Cendrawasih Palu dan SMKN 1 Palu. *J Bidan Cerdas*. 2019;2(1):53.

12. Sumiaty S, Hasnawati H. Health Education with media leaflet against women's knowledge of cervical cancer screening. *Napande J Bidan*. 2022;1(1):15-22.
13. Kumala S, Sapitri DW. Phytochemical screening and toxicological evaluation sing Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) of some fractions of Prasman leaves (*Eupatorium triplinerve* V) extract. *Indones J Cancer Chemoprevention*. 2011;2(1):193.
14. Syahputra, G. (2015). Resazurin si indikator aktivitas sel. *Bio Trends*, 6(2), 26-28.
15. Riskianto, Soemardji AA, Tan MI. Cytotoxic effects of Kirinyuh herb (*Austroeupatorium inulaefolium* (Kunth) R. d. King & H. Robinson) extracts and fractions on BSLT, MCF-7 cells and T-47D cells. *Pharmacogn J*. 2022;14(2):374-8.
16. Fareza MS, Choironi NA, Susilowati SS, Rini MP, Festihawa V, Fauzi ISN, et al. LC-MS/MS analysis and cytotoxic activity of extract and fractions of *Calophyllum soulattri* stem bark. *Indones J Pharm*. 2021;32(3):356-64.
17. Anwar LO, Sari SF, Elo AA, Rosmawati, Nurdin IN, Said A. Uji toksisitas ekstrak cacing tambelo (*Bactronophorus thoracites*) dengan metode brine shrimp lethality test. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 2021; 24(2), 243-248.
18. Praceka MS, Yunita EN, Semesta CD, Putri RN, Mikdar NN, Sitinjak EN, et al. Molecular docking and toxicity from temulawak rhizome (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) against COX-2. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2022; 1(1), 106. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v1i1.43808>
19. Niksic H, Becic F, Koric E, Gusic I, Omeragic E, Muratovic S, Duric K. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports*. 2021;11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92679-x>
20. Tusanti I, Johan A., Kisdjamiatun R. Sitotoksitas in vitro ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa*, reinw. ex bl.) terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal Gizi Indonesia*. 2014; 2(2), 53-58. <https://doi.org/10.14710/jgi.2.2.53-58>
21. Putri RB, Nugrahaningsih WH, Dewi NK. Uji toksisitas ekstrak daun Cassava terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. 2021. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*, 44(2), 86-91. <https://doi.org/10.15294/ijmns.v44i2.33145>
22. Fauziah, Maulinasari, Harnelly E, Ismail YS, Fitri L. Toxicity test of roseperiwinkle (*Catharanthus roseus*) leaves endophytic bacteria using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. *Biodiversitas*, 2022; 23(1), 171-177. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230122>
23. Moorthy P, Rajan M, Sathyanarayanan S, Muniyandi K, Sivaraj D, Sasidharan SP, et al. Effect of different cooking methods of *Hibiscus surratensis* L. leaf vegetable on nutritional, anti-nutritional composition, and antioxidant activities. *J Culin Sci Technol*. 2018;00(00):1-16.
24. Pourahmad J, Salimi A, Seydi E. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development and Treatment. *Free Radicals Dis*. 2016; InTech. doi:10.5772/64787
25. Cockfield JA, Schafer ZT. Antioxidant defenses: A context-specific vulnerability of cancer cells. *Cancers*. 2019;11(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081208>