

Potensi metabolit sekunder produksi bakteri endofit dari tumbuhan laban (*Vitex pubescens Vahl*) sebagai antikanker

Lenny Anwar*, Dedi Futra

Prodi Pendidikan Kimia, Fakultas FKIP, Universitas Riau
Kampus Bina Widya KM 12,5 Simpang Baru, Pekanbaru
e-mail: *lenny_an_war@yahoo.com

Diterima: 30 Oktober 2019 / Disetujui: 18 Desember 2019 / Dipublikasi online: 31 Desember 2019
DOI: <https://doi.org/10.22437/chp.v4i2.7937>

ABSTRAK

*Senyawa bioaktif metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba endofitik memiliki kemampuan mengobati suatu penyakit hampir sama dengan tanaman aslinya, oleh karena itu, pencarian mikroba endofitik yang berpotensi sebagai antikanker sedang rutin dikembangkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit yang terdapat di dalam jaringan kulit batang Laban (*Vitex pubescens Vahl*), dan senyawa bioaktifnya diisolasi dengan pelarut etil asetat serta diuji kemampuan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker HeLa. Bakteri endofitik diisolasi dengan cara menanamkan sampel kulit batan Laban di atas permukaan nutrien agar dan diinkubasi beberapa hari untuk mendapat koloni bakteri endofitik. Metoda Micro tetrazolium (MTT) digunakan untuk menetapkan aktivitas sitotoksik dari ekstrak etilasetat. Bakteri endofit yang berhasil diisolasi sebanyak 3 isolat yaitu Bakteri-2A, Bakteri -3B dan Bakteri-6C. Berdasarkan hasil penapisan dari 3 isolat tersebut didapatkan dua bakteri yang memiliki aktivitas potensial yang baik terhadap sel serviks (HeLa) yaitu isolat Bakteri-6C ($IC_{50} = 82.54 \mu\text{g/mL}$) dan Bakteri-2A ($IC_{50} = 297.09 \mu\text{g/mL}$).*

*Kata kunci: *Vitex pubescens Vahl*, bakteri endofit, sitotoksik, sel serviks (HeLa)*

ABSTRACT

*Bioactive compounds of secondary metabolites are produced by endophytic microbes have ability to treat a disease almost the same as original plant, therefore, search for endophytic microbes that have anticancer potential is being routinely developed. Purpose of this study was to isolate endophytic bacterial contained in Laban bark tissue (*Vitex pubescens Vahl*), to produce bioactive compounds using solvent of ethyl acetate and to test ability of its cytotoxic toward HeLa cancer cells. The endophytic bacteria were immediately isolated from Laban plant by implanting samples of Laban bark tissue on surface of nutrient agar and carefully incubated for several days to obtain a colony of endophytic bacteria. Micro tetrazolium (MTT) method was used to determine the cytotoxic activity of ethyl acetate extract. The results of this work have successfully found three types of endophytic bacteria, namely Bakteri-2A, Bakteri-3B, and Bakteri-6C. Where, two of the three endophytic bacteria have good potential activity toward cervical cell (HeLa). The bacterial isolates were Bakteri-6C ($IC_{50\%} = 82.54 \mu\text{g/mL}$) and Bakteri-2A ($IC_{50\%} = 297.09 \mu\text{g/mL}$).*

*Keywords: *Vitex pubescens Vahl*, endophytic bacteria, cytotoxic, cercical cell (HeLa)*

PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit kanker secara nasional pada penduduk semua umur tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Penyakit kanker serviks merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi yaitu sebesar 0,8% (98.692 orang) disusul kanker payudara sebesar 0,5% (61.682 orang) (Kementrian Kesehatan RI, 2015). Lebih dari 60% obat-obat antikanker berasal dari sumber daya alam. Sebagian besar senyawa obat antikanker tersebut diisolasi dari tumbuh-tumbuhan dan tanaman laut (Lichota, dan Gwozdziński, 2018)

Senyawa bioaktif yang terkandung didalam tanaman relatif dijumpai dalam jumlah kecil, sehingga dibutuhkan tanaman yang sangat banyak untuk memperoleh senyawa bioaktif tersebut. Efisiensi dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba endofit spesifik yang diperoleh dari bagian dalam tanaman yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang dibutuhkan tanpa harus mengekstrak dari tanamannya. Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibakteri, antimalaria, antikanker, *tuberculosis* (TBC) dan antifungi (Bac, *et al.*, 2015; Lie, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2013; Barry, 2014; Kai, *et al.*, 2013). Senyawa bioaktif seperti alkaloid, steroid, terpenoid, peptida, poliketone, flavonoid, kuinol, fenol dan azadirachtin (insektisida alami) diproduksi oleh bakteri endofit (Kusari *et al.* 2012; Molina *et al.* 2012).

Pemilihan tumbuhan inang akan mempengaruhi keunikan dan aktivitas biologis produk yang dihasilkan oleh mikroba endofit tersebut (Yati *et al.*, 2018). Salah satu strategi dalam pemilihan tanaman inang untuk diisolasi endofitnya adalah tanaman yang memiliki sejarah etnobotani (digunakan oleh penduduk lokal untuk pengobatan) (Strobel dan Daisy, 2003).

V. pubescens (Laban) merupakan spesies *Vitex* dengan distribusi terbanyak di Indonesia, tumbuh hampir disemua propinsi di Sumatera dan Kalimantan (Setiawati 2017). Tumbuhan laban telah digunakan oleh masyarakat sebagai obat sakit pinggang, luka, menambah nafsu makan, disentri, gangguan pencernaan, antiinflamasi, antitumor, rhinitis, dan demam (Meena, *et al.*, 2011). Pada tanaman ini telah diisolasi senyawa pinnatasteron, 20-hidroksiekdison, turkesteron, retusin, kaempferol trimetileter dan β -sitosterol (Padmalatha, *et al.*, 2009). Rudrapaul *et al.*, (2014) telah melaporkan adanya luteolin, asam 4-hidroksibenzoat dan asam 3,4-dihidroksibenzoat. Dari kulit batang juga telah

diisolasi senyawa flavonoid (visciosida, apigenin dan luteolin), triterpenoid (asam betulinat dan asam epibetulinat), fenolik (metil p-hidroksibenzoat dan asam p-hidroksibenzot) dan diterpenoid (andrographolida, 14-deoksi andrographolida dan neoandrographolida) (Athar, *et al.*, 2009; Anwar, *et al.*, 2015; Anwar, *et al.*, 2019). Senyawa andrograpolida dan asam betulinat sangat potensial sebagai senyawa antikanker (Luo, *et al.*, 2014; Ghaffari, *et al.*, 2012).

Bakteri endofit yang berada dalam kulit batang laban kemungkinan besar mampu menghasilkan salah satu senyawa aktif tersebut atau senyawa lain yang bersifat sitotoksik. Sejauh ini belum dilaporkan adanya isolasi bakteri endofit dari tanaman laban serta pengujian terhadap senyawa aktif yang diproduksi bakteri endofit dari tanaman tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji bagaimana sifat sitotoksik metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofitik yang terkandung dalam tumbuhan laban. Untuk mengetahui sifat ini dilakukan isolasi bakteri endofitik dari kulit batang laban dan skrining aktifitas antikanker metabolit sekunder yang dihasilkannya. Pengujian aktivitas antikanker dilakukan secara *in vitro* menggunakan *sel line* kanker serviks HeLa dengan metode *Microculture Tetrazolium* (MTT).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Kulit batang tumbuhan *V. pubescens* Vahl yang digunakan dalam penelitian ini diambil di area kampus Universitas Riau. Bahan yang digunakan untuk isolasi dan pengembangan bakteri endofitik adalah nutrien agar (NA), nutrient board (NB), etanol (C₂H₅OH), sodium hipoklorida (NaOCl), plastik tahan panas. Bahan untuk uji sitotoksik terdiri dari sel kanker HeLa, media kultur (RPMI-1640), Dimetil sulfoksida (DMSO), MTT, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl, Tissue.

Alat yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet* (Gelman Sciences PTY. LTD), cawan petri, jarum inokulum/ose, batang penyebar, skalpel, pinset, botol duran, lampu spiritus, mikro pipet, sentrifugasi, tabung sentrifus (10 ml), erlenmeyer (250 mL), pH meter, inkubator bakteri, Shaker dan autoklap. Peralatan untuk uji sitotoksik terdiri dari: pipet mikro, tabung reaksi, rak tabung kecil, *96-wel plate*, *conical tube*, *yellowtip*, *blue tip* dan *ELISA reader*.

Peralatan, media agar dan medium air pertumbuhan disterilkan terlebih dahulu dengan cara autoklap 120°C, pada tekanan 5 Psi selama 20 menit

sebelum digunakan. Semua bahan kimia yang digunakan berkualitas analisis tanpa dilakukan pemurnian.

Isolasi Bakteri Endofit

Sampel berupa kulit batang dicuci dengan air mengalir sampai bersih \pm 5 menit. Sampel tumbuhan yang telah bersih direndam dalam larutan etanol 70% (v/v) selama 5 menit dan selanjutnya direndam dalam larutan sodium hipoklorida (4%) selama 3 menit (Shweta *et al.*, 2013). Permukaan sampel jaringan tumbuhan yang telah steril dicuci tiga kali dengan aquades steril selama 2 menit untuk menghilangkan agen pensteril dan dikeringkan. Sampel yang telah steril dipotong membujur secara aseptik, kemudian ditanam pada cawan petri yang berisi media nutrisi agar (NA). Media yang sudah mengandung sampel diinkubasi pada suhu ruang dan diamati sampai ada pertumbuhan koloni. Bakteri endofit yang tumbuh dimurnikan satu per satu. Isolat bakteri endofit yang telah murni diidentifikasi secara morfologi berdasarkan warna koloni, bentuk tepian koloni, elevasi koloni dan konsistensi koloni serta kecepatan pertumbuhan koloni (Desriani *et al.*, 2013).

Pengujian Gram Bakteri dan Katalase

Pengujian gram bakteri endofit dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 tetes KOH 3% diletakkan pada object glass steril. Selanjutnya koloni tunggal bakteri endofit diambil dengan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek steril dan diaduk secara merata dengan jarum ose. Jika terbentuk lender, ini menanda bakteri tersebut adalah gram negative, jika tidak berlendir mengindikasikan bakteri gram positif (Forbes *et al.*, 2007).

Pengujian katalase dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2-3 tetes H₂O₂ 3% diletakkan pada kaca preparat steril. Jarum Ose steril digunakan untuk mengambil isolat bakteri dan dipindahkan ke atas kaca objek untuk dicampurkan dengan larutan H₂O₂. Pengujian bernilai positif jika terbentuknya gelembung-gelembung oksigen dan negatif ditandai dengan tidak adanya gelembung oksigen pada isolat bakteri (Reiner, 2016).

Fermentasi Produksi Senyawa Antimikroba

Fermentasi cair dilakukan dengan menggunakan medium fermentasi Nutrient Board (NB) sebanyak 250 ml dalam erlemeyer 500 mL. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (27°C) selama 2 hari dengan kecepatan *shaker* 170 rpm. Biomassa sel dipanen dengan menggunakan sentrifuge berpendingin 3000

rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dari hasil sentrifuge dipartisi dengan etilasetat, dievaporasi dan digunakan untuk uji hayati.

Uji Hayati

Sel HeLa (koleksi Laboratorium Parasitologi, UGM) dikultur dalam media RPMI 1640 yang mengandung 10% *fetal bovine serum* (FBS) dan 1% antibiotik penisilin-streptomisin. Selanjutnya sel diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% pada temperatur 37°C selama 24 jam.

Sel (1×10^4 sel/mL, 100 µL) didistribusikan pada 96-well plate. Setelah ditumbuhkan selama 24 jam, pada kultur tersebut ditambahkan larutan senyawa uji. Setelah diinkubasi selama 24 jam ditambahkan 10 µL larutan MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan larutan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (HCl 10% dalam SDS), diinkubasi semalam pada suhu kamar. Selanjutnya plat 96 sumuran dibaca absorbansinya dengan *ELISA reader* pada λ 595 nm (Putri, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri endofit

Isolasi yang dilakukan untuk mendapatkan bakteri endofit dari kulit batang laban dilakukan dengan metode tanam langsung ke dalam medium agar. Sebanyak tiga isolat bakteri endofit telah berhasil diisolasi dari kulit batang laban yang berasal dari Pekanbaru, Riau. Morfologi koloni, bau medium dan kecepatan tumbuh bakteri endofit hasil isolasi diringkaskan pada Tabel 1. Morfologi bakteri endofit dilihat dari aspek tepian bentuk bergerigi, halus, dan licin. Sedangkan dari bentuk elevasi, bakteri endofit memiliki permukaan datar dan memiliki warna koloni putih. Kecepatan tumbuh bakteri endofit dikategorikan dari cepat hingga sedang. Secara umum, isolat bakteri endofit hasil isolasi menunjukkan keragaman dari segi tepian, bau medium dan kecepatan pertumbuhan.

Keragaman bakteri endofit dalam suatu tanaman dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman, khususnya kondisi tanah. Pada beberapa kasus, tanaman dengan jenis atau spesies yang sama memiliki bakteri endofit yang tidak selalu sama (Bhore dan Sathisha 2010). Bakteri endofit pada umumnya berkolonisasi di jaringan intraseluler sedangkan jamur endofit dapat ditemukan dalam jaringan inter maupun intraseluler (Compant, *et al.*, 2010).

Tabel 1. Morfologi koloni, bau medium dan kecepatan pertumbuhan isolat bakteri endofit dari kulit batang laban.

Kode isolat	Morfologi Koloni			Bau Medium	Kecepatan tumbuh*
	Tepian	Elevasi	Warna		
Bakteri-2A	Licin	Datar	Putih	Berbau	Cepat
Bakteri-3B	Bergerigi, halus	Datar	Putih	Berbau kuat	Sedang
Bakteri-6C	Bergerigi, licin	Datar	Putih	Berbau	Cepat

Keterangan: *Cepat = 1 hari, sedang = 2 hari dan lama = 3 hari.

Karakterisasi Bakteri Endofit Tumbuhan Laban

Karakterisasi bakteri endofit tumbuhan laban dilakukan dari aspek pengujian gram dan sifat katalasenya. Hasil pengujian gram dan katalase ditunjukkan dalam Tabel 2. Pengujian gram bakteri endofit didapatkan bakteri-2A dan bakteri-6C digolongkan bakteri gram negatif (berlendir), sedangkan bakteri-3B digolongkan bakteri gram positif (tidak berlendir). Bakteri-2A dan bakteri-6C menimbulkan lendir pada waktu pemberian KOH. Ini menandakan bahwa bakteri ini memiliki peptidoglikan yang tipis pada dinding selnya, sehingga pada saat pemberian KOH dinding sel rusak dan menyebabkan getah dalam sel bakteri keluar, dan menghasilkan lendir saat ditarik dengan jarum inokulum (Forbes *et al.*, 2007; Hinton and Ingram 2006). Sedangkan bakteri-3B memiliki peptidoglikan yang tebal, sehingga KOH tidak bisa merusak dinding selnya.

Tabel 2. Pengujian gram dan katalase bakteri endofitik kulit batang tumbuhan Laban

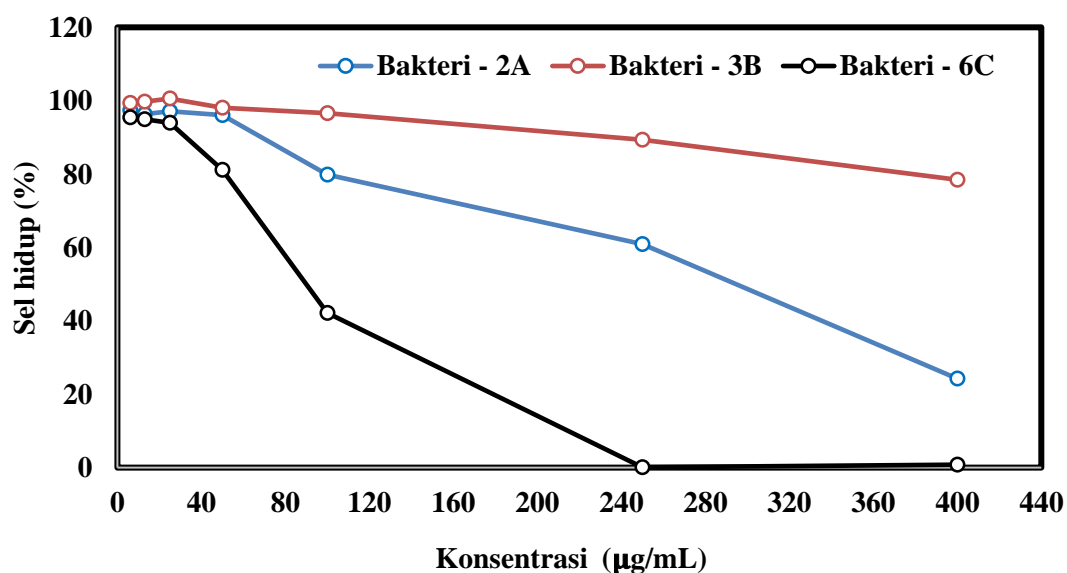
Kode Isolat	Karakteristik Bakteri Endofit	
	Gram	Katalase
Bakteri-2A	-	+
Bakteri-3B	+	+
Bakteri-6C	-	+

Pengujian katalase terhadap bakteri endofit didapatkan semua isolat menghasilkan reaksi positif. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang secara alami terdapat dalam sel bakteri endofit telah mengkatalisa penguraian H_2O_2 menjadi H_2O dan gas O_2 . Dimana, molekul H_2O_2 terbentuk saat sel melakukan metabolisme secara aerob, sehingga bakteri tumbuh dalam kondisi aerob dapat menguraikan molekul H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Reiner, 2016).

Pengujian Sitotoksisitas Supernatan Isolat Bakteri Endofit

Untuk pengujian sitotoksisitas, sel kanker servik (sel HeLa) ditambahkan secara langsung kepada seri konsentrasi ekstrak etilasetat bakteri endofit dari 6–

400 $\mu\text{g/mL}$. Berbagai konsentrasi ekstrak etilasetat bakteri endofit yang ditambahkan pada sel kanker serviks dilukiskan pada Gambar 1. Respon sitotoksitas yang tinggi untuk membunuh sel kanker teramati pada bakteri-6C. Sedangkan respon sitotoksitas dengan kategori sedang dan rendah didapati pada bakteri-2A dan bakteri-3B. Pada konsentrasi ekstrak etilasetat rendah (6-13 $\mu\text{g/mL}$, Bakteri-6C) ditambahkan pada sel kanker dan diperoleh sel kanker mati < 10%. Pada konsentrasi yang ditingkatkan menjadi 25-400 $\mu\text{g/mL}$, sinyal kematian sel terjadi secara drastis dan diamati sel kanker hidup mendekati nol ($\sim 0\%$ sel hidup). Nilai IC_{50} ekstrak etilasetat bakteri endofit terhadap kemampuan membunuh sel kanker ditemukan untuk Bakteri-6C, Bakteri-2A dan Bakteri-3B masing-masing secara berturut-turut adalah 82,53; 297,09; dan 920,57 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 3).



Gambar 1. Efek berbagai konsentrasi ekstrak etilasetat bakteri endofit yang ditambahkan kepada sel HeLa

Pada konsentrasi supernatan isolat tinggi ditemukan sel kanker hidup mendekati 0%. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak etilasetat bakteri endofit mengandung senyawa metabolit sekunder yang aktif dan membawa kematian pada sel kanker (Susanty, *et al* 2018). Disamping itu, faktor yang lain yang menyebabkan kematian sel kanker dikontribusikan oleh senyawa metabolit sekunder yang bersifat lipofilitas yang mengandung gugus nonpolar pada cincin aromatik dapat mempengaruhi proses transformasi pasif antar komponen dalam sel kanker, sehingga membawa kematian pada sel kanker (Nurani, 2011).

Tabel 3. Nilai IC₅₀ ekstrak etilasetat bakteri endofit terhadap kemampuannya membunuh sel HeLa

Kode isolat	Nilai IC _{50%} (µg/mL)	% RSD
Bakteri – 2A	297,09	4,093
Bakteri – 3B	920,57	3,836
Bakteri – 6C	82,54	3,919

KESIMPULAN

Isolasi bakteri endofit dari tanaman laban (*V. pubescens* Vahl) berhasil diperoleh 3 bakteri endofit. Uji penapisan 3 ekstrak etilasetat bakteri endofit terhadap sel HeLa menunjukkan bahwa 2 isolat memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber senyawa sitotoksik yaitu isolat bakteri-6C dan bakteri-2C dengan IC₅₀ 82,54 dan 297,09 µg/mL. Meski demikian, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengidentifikasi spesies isolat potensial dan mengisolasi senyawa kimia yang berpotensi sebagai obat kanker yang dihasilkan oleh isolat bakteri-6C.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Universitas Riau atas pemberian dana DIPA LPPM melalui Penelitian Dosen Muda dengan nomor kontrak 642/UN19.5.1.3/PT.01.03/2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, L., Ibrahim, S., Putra, D.P., Efdi, M. 2015. Labdane-Type Diterpenoid And Phenolic From The Stem Bark Of *Vitex Pubescens* Vahl. *Journal_of_Chemical_and_Pharmaceutical_Research*. 7(10):290-294.
- Anwar, L., Santoni, A., Putra, D.P., Efdi, M., 2019. Structure Elucidation of a Pentacyclic Triterpenoid and Phenolic from Stem Bark of *Vitex Pubescens* Vahl. *Journal of Chemical Natural Resources*. 1(1):68-74
- Bae M, Chung B, Oh KB, Shin J, Oh DC. 2015. Hormaomycins B and C: New Antibiotic Cyclic Depsipeptides from a Marine Mudflat-derived *Streptomyces* sp. *Mar Drugs*. 13:5187–5200.
- Barry, CE. 2014. Tuberculosis Drug Discovery Goes au Naturel. *Nature*. 27:436–437.
- Bhore SJ, Sathisha G. 2010. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World J. Agric. Sci*. 6 (4): 345-352.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitch, A., Nowak, J., Clement, C., Barka, A.E. 2010. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-promoting Bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71 : 1685 – 1693.

- Desriani, Kusumawati DE, Rivai A, Hasanah N, Amrinola W, Triratna L, Sukma A. 2013. Potential endophytic bacteria for increasing paddy var rojolele productivity. *Int. J. on Adv. Sci., Eng. and Information Tech.* 3 (1): 76-78.
- Ganapaty, S., dan Vidyadhar, K.N., Phytoconstituents and Biological Activities of *Vitex-a* Review, *Journal of Natural Remedies*, 5(2):75-95.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 12th Edition, Elsevier. New York. 80 -81
- Ghaffari, M.M., Ahmad, F., Samzadeh-Kermani, A. 2012. Biological activity of betulinic acid: A review. *Pharmacology & Pharmacy*. 3:119-123
- Hinton, A, Ingram, K.D. 2006. Antimicrobial activity of potassium hydroxide and lauric acid against microorganisms associated with poultry processing. *Journal of Food Protection*. 69(2): 1611-1615
- Kai H, Yamashita M, Takase S, Hashimoto M, Muramatsu H, Nakamura I. 2013. KB425796-A, a Novel Antifungal Antibiotic Produced by *Paenibacillus* sp. 530603. *J Antibiot.* 66:465-471.
- Kementrian Kesehatan RI. 2015. Infodatin, Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI. Kementrian Kesehatan. Jakarta.
- Kusari S, Verma VC, Lamshoeft M, Spiteller M. 2012. An Endophytic Fungus from *Azadirachta Indica* A. Juss. that Produces Azadirachtin. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1287-1294
- Li J, Zhao GZ, Varma A, Qin S, Xiong Z, Huang HY. 2012. An Endophytic *Pseudonocardia* Species Induces the Production of Artemisinin in *Artemisia annua*. *PLoS One.* 7:e51410.
- Luo, X., Luo, W., Lin, C., Zhang, L., Li, Y. 2014. Andrographolide Inhibits Proliferation of Human Lung Cancer Cells and the Related Mechanisms. *Int J Clin Exp Med.* 7(11):4220-4225
- Meena, A. K., Niranjana, U.S., Rao, M.M., Padhi, M.M. dan Babu, R., 2011, A Review of the Important Chemical Constituents and Medicinal Uses of *Vitex* Genus, *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6(2).
- Molina G, Pimentel MR, Bertucci TCP, Pastore GM. 2012. Application of Fungal Endophytes in Biotechnological Processes. *Chem Eng Trans.* 27:289-294
- Nurani L.H. 2011. Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Fraksi Etilasetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*, Lour) terhadap Sel Mieloma. *Farmasains.* 2(1): 11-21.
- Padmalatha, K., Jayaram, K., Raju, N.L., Prasad, M.N.V., Arora, R., 2009, Ethnopharmacological and Biotechnological Significance of *Vitex*, *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 3(1):6-14.
- Putri, H. 2013. Protokol uji sitotoksik metode MTT, Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). Yogyakarta:Fakultas Farmasi, UGM.
- Reiner, K. 2016. Catalase test protocol. In: ACM Microbelibrary - Laboratory protocols. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Setiawati. 2017. Utilization of Laban wood (*Vitex pubescens* Vahl) as raw materials traditional charcoal by communities; a case study at Jembayan village East Kalimantan. *International Journal of Scientific and Technology Research.* 6(2); 122-125

- Shweta, S., Bindu, J. H., Raghu, J., Suma, H. K., Manjunatha, B.L., Kumara, P.M., Ravikanth, G., Nataraja, K.N., Ganeshaiyah, K. N., Shaanker, R. U. 2013. Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (Icacinaceae). *Phytomedicine*. 20: 913–917.
- Singh S, Bindu H, Raghu J, Suma HK, Manjunatha BL, Kumara PM. 2013. Isolation of Endophytic Bacteria Producing the Anticancer Alkaloid Camptothecine from *Miqueliadentata* Bedd. (Icacinaceae). *Phytomedicine* 20:913–917.
- Susanty, Dachriyanus, Yanwirasti, F.S. Wahyuni, H. Fadhli, P.A. Aswan. 2018. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Daun Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Bl.) K.Schum) pada Kanker Kolon HTB-38. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 5(2): 142-146
- Yati, S.J., Sumpono, Candra, I.N. 2018. Potensi aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari bakteri endofit pada daun *Maringa oleifera*, L. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 2(1): 82-87.