

## AKTIFITAS ANTI-PROLIFERASI DAN ANTI-INVASI DARI EKSTRAK KLOOROFORM DAN METANOL DAUN NUSA INDAH PUTIH (*Mussaenda philippica*) PADA SEL LESTARI TUMOR SECARA IN VITRO

(*In Vitro* Anti-Proliferation and Anti-Invasion Activities of *Mussaenda Philippica* Chloroform and Methanol Extracts on Derived Tumor Cell Lines)

BAMBANG PONTJO PRISOERYANTO<sup>1</sup>, GUNANTI<sup>2</sup>, HERNOMOADI HUMINTO<sup>1</sup> dan ROS SUMARNY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi, Departemen Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Bogor

<sup>2</sup>Laboratorium Bedah, Departemen Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Bogor

<sup>3</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Puncasila, Jakarta

### ABSTRACT

A growth inhibition effect study of *Mussaenda philippica* leave extracts was conducted using two tumor derived cell lines, canine mammary gland tumor (MCM-B2) and human leukemia (K562) in order to evaluate their activities on cell proliferation and invasion. The plants were extracted using chloroform and methanol solutions. Lethal concentration-50 (LC<sub>50</sub>) of the extracts were determined using Brine Shrimp Lethality Test. The anti-proliferation activity of the extracts was performed using a Trypan Blue staining methods and the cells were counted with a hemacytometer. The plant extracts were significantly inhibited the proliferation of tumor derived cell lines *in vitro* (P<0.05) and this activity was dose dependent. The LC<sub>50</sub> for chloroform extract of was 72.8262 ppm, and the tested dose for this extract were 50, 75, 100 dan 125 ppm while for methanol extract the LC<sub>50</sub> was 264.115 ppm and the tested dose were 50, 300, 550, 800 ppm. The highest growth inhibition effect of the chloroform extract on each cell lines were 45% for MCM-B2 cell and 37% for K562 cell, this activity was occurred on the dose of 100 ppm. On the methanol extract, the highest activity for MCM-B2 cell lines was 52% at the concentration of 550 ppm, while on the K562 cell was 40% and achieved on the dose of 800 ppm. The invasion capability of tumor cells was also inhibited by the two extracts. From this study we concluded that chloroform and methanol extracts of *Mussaenda philippica* contained substances that can inhibit the growth of some tumor cell *in vitro*, therefore we suggest that both extracts have a possibility and could be used as a source of anti-tumor substances in the treatment of tumor disorders both in animal and human. Isolation and identification of the bioactive compounds of both plants are in progress.

**Key words:** Anti-proliferation, anti-invasion, *in vitro*, tumor cell, *Mussaenda philippica*

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi secara *in vitro* dari ekstrak kloroform dan metanol daun nusa indah putih (*Mussaenda philippica*) pada dua jenis sel lestari tumor yaitu sel tumor leukemia manusia K562 dan sel tumor payudara anjing MCM-B2. Empat tingkatan dosis masing masing dari ekstrak yaitu ekstrak kloroform (50, 75, 100 dan 125 ppm) dan ekstrak metanol (50, 300, 550, 800 ppm) digunakan dalam penelitian ini. Kedua ekstrak ternyata mempunyai daya anti-proliferasi terhadap kedua sel uji (P<0,05), dan persentase penghambatan pertumbuhan ini berkorelasi dengan meningkatnya dosis ekstrak. Dosis 100 ppm ekstrak kloroform tampaknya merupakan dosis optimal dalam penghambatan proliferasi sel tumor K562 (sebesar 37%) maupun MCM-B2 (sebesar 45%), sedangkan untuk ekstrak metanol dosis 800 ppm memberikan aktifitas penghambatan tertinggi pada sel tumor K562 (sebesar 40%) dan untuk sel lestari MCM-B2 penghambatan tertinggi sebesar 52% terjadi pada dosis 550 ppm. Daya invasi sel lestari tumor pada media gel kolagen juga dihambat dengan pemberian kedua jenis ekstrak tersebut di atas. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa ekstrak kloroform maupun metanol dari daun nusa indah memiliki aktifitas dalam menghambat proliferasi dan invasi sel tumor lestari secara *in vitro*, dan hal ini memberikan harapan bahwa kedua ekstrak tersebut dapat digunakan dalam mengatasi penyakit tumor pada hewan maupun manusia. Isolasi dan identifikasi kandungan bahan bioaktif dari ekstrak tanaman ini sedang dilakukan.

**Kata kunci:** Anti-proliferasi, anti-invasi, *in vitro*, sel tumor, *Mussaenda philippica*

## PENDAHULUAN

Tumor atau neoplasma merupakan salah satu penyakit yang akhir-akhir ini banyak dan kerap ditemui baik pada hewan maupun manusia. Dari hasil kami terdahulu diketahui bahwa kejadian penyakit tumor pada anjing yang di nekropsi di Laboratorium Patologi Veteriner FKH-IPB sekitar 22% (PRIOSOERYANTO *et al*, 1998a) dan dari tahun ke tahun persentase kejadian ini terus meningkat (PRIOSOERYANTO *et al*, 1998b).

Banyaknya variasi morfologi dari penyakit tumor pada hewan menyebabkan sering terjadinya kesulitan dalam diagnosis menggunakan sediaan histopatologi dilapangan. Variasi morfologi ini terjadi karena jaringan tumor terus mengalami pertumbuhan hingga variasi bentuk, jenis dan sifat-sifat sel pun mengalami perbedaan satu dengan lainnya, terutama pada tumor-tumor yang bersifat anaplastik (PRIOSOERYANTO, 1994). Dalam kaitan dengan cara mendiagnosa, penanganan penyakit tumor dan pengobatan serta pengembangan obat-obatan dan substansi biologik yang bersifat antitumor, pemahaman lebih mendalam mengenai aspek biologi, morfologi, karakter, metastasis dan patogenesis sel tumor mutlak diperlukan (PRIOSOERYANTO *et al*, 1998a).

Invasi adalah suatu proses dimana satu jenis sel tumor melakukan penetrasi ke jaringan lain yang sel penyusunnya berbeda dari sel tumor penginvasi. Proses invasi ini merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan peran dari berbagai faktor biokimia dan seluler dari hewan penderita. Karsinoma yang bersifat invasif biasanya dimulai dengan suatu tahapan yang berkaitan dengan proses infiltrasi pada membrana basalis yang terdiri dari jaringan kolagen dan non-kolagen. Degradasi dari jaringan kolagen berperan sangat penting dalam proses penghancuran protein dari membrana basalis. Semua jenis tumor yang bersifat invasif dan metastasis melakukan proses di atas dengan menghasilkan beberapa enzim protease.

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kekayaan alam yang sangat besar, termasuk di dalamnya adalah berbagai tanaman obat. Badan POM Depkes RI mengindikasikan bahwa dari sekitar 326 perusahaan di Indonesia yang bergerak dalam

bidang farmasi, kosmetika dan makanan menggunakan 180 jenis tanaman. Jumlah total bahan baku yang digunakan kurang lebih sebanyak 6.223 ton. Badan POM juga mencatat bahwa terdapat 45 jenis obat yang sangat penting yang digunakan di Amerika berasal dari tanaman dan ternyata 18 jenis diantaranya berasal dari Indonesia. Tampak bahwa kecenderungan penggunaan bahan asal tanaman saat ini terus meningkat seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang menunjangnya. Penelitian kami terdahulu (HARRAN *et al*, 2001; PRIOSOERYANTO *et al*, 2001; TUMILISAR *et al*, 2001) juga memperlihatkan bahwa beberapa ekstrak tanaman mempunyai aktifitas anti-tumor dengan cara menghambat proliferasi sel tumor secara *in vitro*.

Dalam studi ini akan diusahakan pemahaman mekanisme invasi dan metastasis sel tumor dalam usaha mengatasi atau menghambat proses invasi dan metastasis serta pencarian alternatif pendekatan penanggulangan penyakit tumor dengan memanfaatkan bahan asal tanaman. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam usaha pencegahan dan pengobatan penyakit tumor baik pada hewan piara dan juga pada manusia.

## BAHAN DAN METODE

### Biakan sel lestari tumor

Biakan sel lestari yang berasal dari hewan dan manusia digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi aktifitas antiproliferasi dan antimetastasis dari ekstrak kloroform dan methanol tanaman terpilih. Biakan sel lestari yang digunakan adalah sel MCM-B2 (PRIOSOERYANTO *et al*, 1995a) berasal dari tumor payudara anjing, dan K562 sel tumor leukemia asal manusia. Kedua jenis sel ini dipelihara dan ditumbuhkan kembangkan dalam medium DME/F-12 yang berisi 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penisilin dan 100 µg streptomisin dalam inkubator CO<sub>2</sub> bersuhu 37°C. Biakan sel lestari ini kemudian disimpan dalam nitrogen cair (-196°C) hingga siap dipergunakan untuk pengujian aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi secara *in vitro*.

### Ekstraksi bahan asal tanaman

Ekstraksi bahan asal tanaman *Mussaenda philippica* yang memiliki potensi anti-proliferasi dan penghambatan invasi sel tumor dilakukan menggunakan cara HARRAN *et al.*, (2001) dan PRIOSOERYANTO *et al.*, (2001). Sebanyak 1 kg serbuk simplisia dimaserasi dengan menggunakan 750 ml metanol 90% maupun chloroform dalam tabung Erlenmeyer, ditutup dan dibiarkan selama 24 jam terlindung dari cahaya, lalu disaring menggunakan kertas saring. Ampas ditambahkan cairan penyari secukupnya, diaduk dan disaring sehingga diperoleh seluruh sari, hal ini dilakukan berulang-ulang hingga filtrat terakhir tampak jernih. Seluruh filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan penguap berputar sampai diperoleh ekstrak kental.

### Penentuan lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>)

Penentuan dosis LC<sub>50</sub> dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* mengikuti cara MAYER *et al.*, (1982). Telur udang laut *Artemia salina* di taburkan dalam bejana penetas yang berisi air laut sintetik dan disimpan di bawah lampu. Setelah 24 jam, telur yang sudah menetas menjadi naupli dipindahkan ketempat lain, 24 jam kemudian naupli tersebut sudah siap untuk digunakan dalam pengujian. Pengujian dilakukan dengan cara ke dalam tempat (vial) yang sudah disediakan dimasukkan 5 ml air laut sintetik yang berisis 10 ekor naupli, selanjutnya ditambahkan larutan bahan ekstrak dengan kandungan yang telah ditentukan, kemudian diletakkan di bawah sinar lampu. Setelah 24 jam, naupli yang hidup dan yang mati dihitung. Pengujian dilakukan dengan 3 kali ulangan. Data yang diperoleh kemudian diolah sehingga didapatkan kadar LC<sub>50</sub>.

### Kolagen gel

Kolagen tipe I yang berasal dari tendon hewan (Cell matrix IA) setelah diencerkan menurut petunjuk dari pabrik pembuat dan ditambahkan DME/F-12 medium serta FCS dan antibiotik digunakan sebagai media tumbuh. Sel-sel tunggal dari tumor kemudian dicampur dengan kollagen gel dan dituang

kedalam cawan petri dengan ketebalan 0,3 cm kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> bersuhu 37°C. Pengamatan pertumbuhan sel tumor dilakukan setiap 12 jam menggunakan mikroskop fase kontras.

### Pengujian aktifitas anti-proliferasi, anti-invasi dan anti-metastasis

Pengujian anti-proliferasi dan anti-invasi dari ekstrak tanaman *Mussaenda philippica* pada sel lestari tumor secara *in vitro* dilakukan dengan memakai metode yang dideskripsikan oleh PRIOSOERYANTO *et al.*, (2000). Dosis yang digunakan adalah kelipatan dari dosis LC<sub>50</sub> dengan 4 tingkatan dosis dan satu kontrol negatif. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media cair untuk antiproliferasi dan media semipadat gel kolagen untuk anti-invasi. Ke dalam biakan sel yang ditumbuhkan dalam cawan petri dengan kepadatan tertentu, ditambahkan sejumlah ekstrak tanaman. Pada hari yang telah ditentukan (tergantung dari jenis sel lestari tumor) pada saat biakan sel pada cawan petri kontrol mencapai *confluence*, biakan sel dipanen dan dihitung jumlah total sel menggunakan metode pewarnaan *Trypan blue* dengan alat hemositometer. Persentase penghambatan dihitung berdasarkan perbandingan jumlah total sel dalam cawan petri kontrol dan cawan petri perlakuan (PRIOSOERYANTO *et al.*, 1995b). Pengamatan untuk anti-invasi dilakukan dengan melihat daya invasi sel tumor di dalam media gel kolagen.

### Analisa data

Semua data kuantitatif yang didapat diuji menggunakan uji statistik, sedangkan data kualitatif dideskripsikan secara naratif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>)

Dengan menggunakan larva udang *Artemia salina*, diketahui bahwa kadar LC<sub>50</sub> dari masing-masing ekstrak tanaman adalah seperti disajikan pada Tabel 1. di bawah ini:

**Tabel 1.** Lethal concentration 50 ( $LC_{50}$ ) dari masing-masing ekstrak tanaman

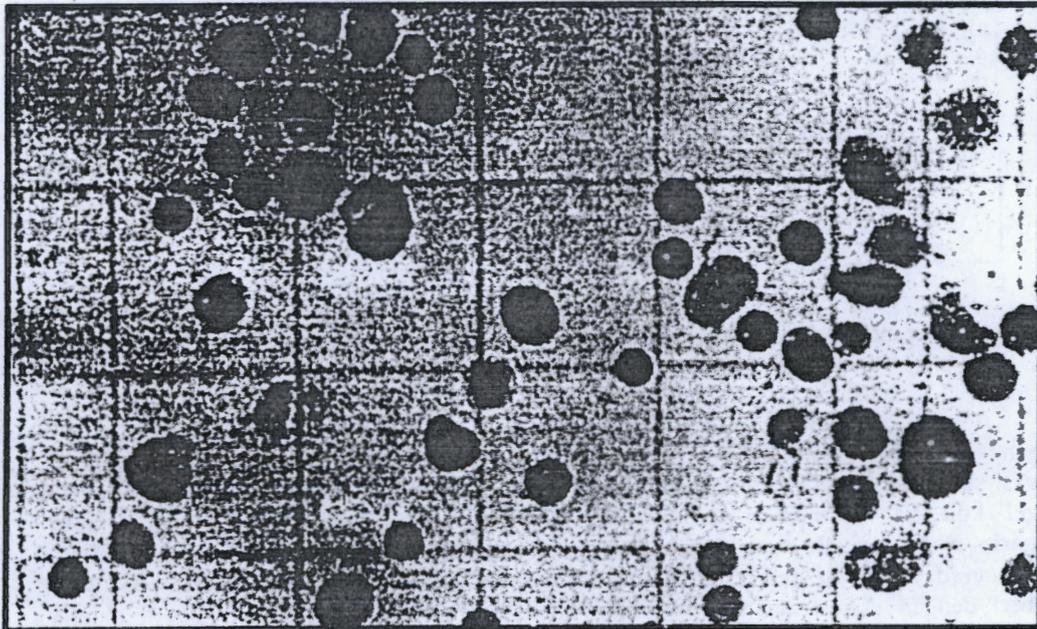
Jenis ekstrak tanaman	$LC_{50}$ (ppm)
Ekstrak kloroform daun nusa indah	72,8262
Ekstrak metanol daun nusa indah	264,115

Dari hasil uji  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak tanaman tampak bahwa ekstrak ekstrak kloroform daun nusa indah sekitar 3,5 kali lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak metanol. Berdasarkan kadar  $LC_{50}$  ini, ditentukan kadar yang akan digunakan pada pengujian selanjutnya dalam penentuan aktifitas antiproliferasi dan antimetastasis dari sel lestari tumor secara *in vitro*.

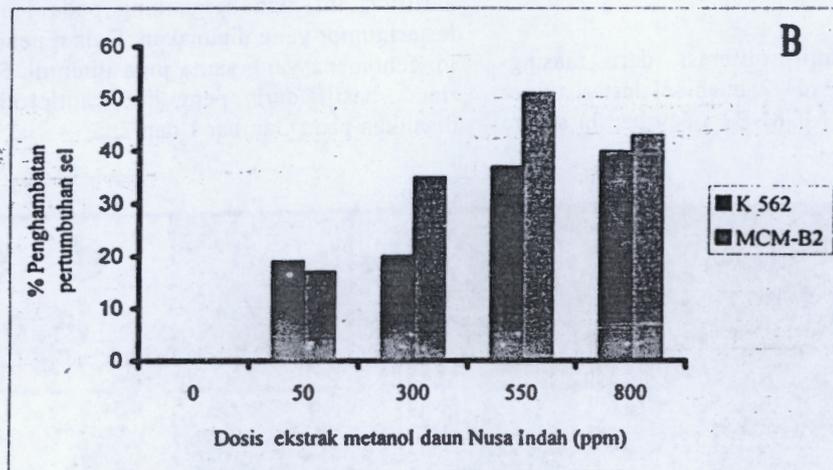
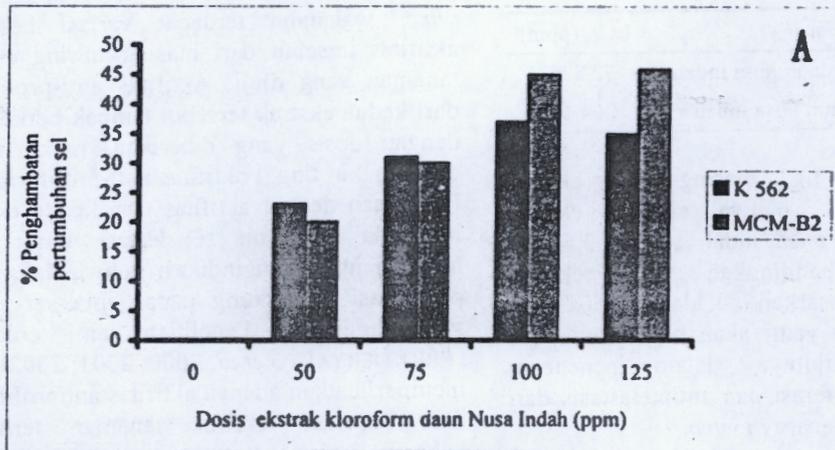
#### Pengujian aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi

Pengujian anti-proliferasi dari masing-masing ekstrak pada 2-buah sel lestari tumor yaitu K562 dan MCM-B2 (Gambar 1) secara

umum memperlihatkan adanya penghambatan pada pertumbuhan sel tumor tersebut secara *in vitro*, walaupun terdapat variasi besarnya aktifitas tersebut dari masing-masing ekstrak tanaman yang diuji. Aktifitas anti-proliferasi dari kedua ekstrak tersebut tampak berkorelasi dengan dosis yang diberikan, makin besar dosis makin tinggi aktifitas anti-proliferasinya. Perbedaan derajat aktifitas dari kedua ekstrak ini pada dua jenis sel lestari tumor yang berbeda juga mengindikasikan bahwa daya anti-proliferasi bergantung pada jenis sel tumor yang digunakan. Penelitian kami terdahulu (PRIOSOERYANTO *et al*, 2000; 2001; 2002) juga memperlihatkan adanya aktifitas antiproliferasi dari beberapa ekstrak tanaman terhadap beberapa jenis sel lestari tumor secara *in vitro*. Aktifitas tersebutpun bervariasi diantara beberapa ekstrak tanaman tersebut, tampaknya aktifitas ini juga bergantung pada jenis sel lestari tumor yang digunakan. Dalam penelitian ini fenomena yang sama juga ditemui. Secara rinci hasil dari pengujian antiproliferasi disajikan pada Gambar 1 dan 2.



**Gambar 1.** Sel lestari tumor MCM-B2 yang telah diberi ekstrak tanaman dan dihitung jumlah sel total dengan menggunakan hemositometer dan pewarnaan Trypan Blue. Sel yang mati tampak berwarna biru



Gambar 2. Aktifitas antiproliferasi dari ekstrak Kloroform (A) dan ekstrak metanol (B) Daun Nusa Indah pada sel lestari tumor K 562 dan MCM-B2

Pengamatan terhadap penghambatan dari daya invasi sel tumor lestari pada media semi padat gel kolagen memperlihatkan bahwa secara garis besar terjadi perlambatan dan penghambatan daya invasi sel lestari tumor yang diberi dengan ekstrak tanaman terpilih. Besarnya daya hambat invasi ini tampak bervariasi pada masing-masing ekstrak tanaman yang digunakan. Metode pembiakan sel dengan menggunakan gel kolagen dalam hal pengamatan aktifitas invasi sel tumor secara *in vitro* sudah dilakukan oleh beberapa peneliti (LIOTTA *et al.*, 1983; NABESHIMA *et al.*, 1986).

Invasi adalah suatu proses dimana satu jenis sel tumor melakukan penetrasi ke jaringan lain yang sel penyusunnya berbeda dari sel tumor penginvasi. Proses invasi ini merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan peran dari berbagai faktor biokimia dan seluler dari hewan penderita. Karsinoma yang bersifat invasif biasanya dimulai dengan suatu tahapan yang berkaitan dengan proses infiltrasi pada membrana basalis yang terdiri dari jaringan kolagen dan non-kolagen. Degradasi dari jaringan kolagen berperan sangat penting dalam proses penghancuran protein dari membrana basalis. Semua jenis

tumor yang bersifat invasif dan metastasis melakukan proses di atas dengan menghasilkan beberapa enzim protease. Matriks ekstraseluler dari hewan penderita merupakan suatu penghalang (*barrier*) mekanik yang mencegah terjadinya invasi sel tumor. Proses invasi sel tumor ini dimulai dengan mendegradasi dari matrik ekstraseluler dengan adanya beberapa bahan yang bersifat proteolitik yang disekresikan oleh sel tumor (LIOTTA *et al.*, 1983). Agresifitas dan morfologi dari sel tumor secara *in vivo* mungkin dipengaruhi oleh kekuatan dari jaringan sekitar dimana tumor berada, terutama matriks ekstraseluler.

Secara fisik morfologik, ENAMI *et al.* (1985) menginvestigasi adanya hubungan antara konsentrasi kolagen dan kekuatan dari gel dengan membandingkan antara konsentrasi kolagen 0,1 dan 0,63%, dimana dengan meningkatnya konsentrasi meningkat pula kekuatan gel. Berbeda dengan pembiakan sel dalam cawan petri menggunakan media cair, pembiakan sel lestari (*cell lines*) asal tumor MCM-B2 dengan menggunakan media kolagen gel 0,1% berhasil membentuk koloni sel tumor tiga dimensi dengan pola pertumbuhan membentuk struktur (*duct-like structure*) (PRIOSOERYANTO *et al.*, 1995a). Dari hasil penelitian kami tersebut, pembiakan sel menggunakan media kolagen gel tampaknya sangat baik dan mudah untuk mengamati karakteristik sel tumor secara *in vitro* yang mendekati kondisi *in vivo*. Dengan demikian tampaknya media matrik kolagen gel sangat baik digunakan untuk studi prolifarsi, diferensiasi dan infiltrasi dari sel tumor.

Tanaman Nusa Indah diketahui mengandung beberapa bahan seperti asam arjunolik, beta-sitosterol, stigmasterol dan triterpenoid saponin yang disebut mussaendosides G and K (WIJAYAKUSUMAH *et al.*, 1992; ZHAO *et al.*, 1996; DALIMARTHA, 1999; ANONIMOUS, 2001a,b). Secara tradisional, tanaman ini digunakan sebagai obat cacing pada anak-anak, menghilangkan rasa sakit di punggung dan antitumor (WIJAYAKUSUMAH *et al.*, 1996; DALIMARTHA, 1999), dan juga untuk demam, *heat shock*, anti-radang dan diare (WIJAYAKUSUMAH *et al.*, 1992).

Dari penelitian ini tampak bahwa proliferasi dan kecepatan invasi sel tumor dihambat oleh adanya pemberian ekstrak kloroform dan metanol dari tanaman

*Mussaenda philippica*, hal ini mengindikasikan bahwa di dalam ekstrak tanaman tersebut terdapat suatu bahan yang bersifat dapat menghambat proses proliferasi dan invasi sel tumor ke jaringan yang lebih dalam. Kami menyimpulkan bahwa kedua ekstrak dari tanaman *Mussaenda philippica* ini dapat dikembangkan dan digunakan sebagai salah satu bahan dalam mengobati penyakit tumor, namun demikian penelitian lebih lanjut dalam hal isolasi dan identifikasi serta toksisitas dan keamanannya perlu dilakukan sebelum penggunaannya di lapangan.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak kloroform dan metanol dari tanaman *Mussaenda philippica* memiliki aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi pada dua buah sel lestari tumor MCM-B2 dan K-562.
2. Aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi ini bergantung pada dosis dan jenis sel tumor yang digunakan.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dari aktifitas anti-proliferasi dan anti-invasi ekstrak tanaman ini dengan menggunakan jenis sel tumor yang lain secara *in vitro* maupun *in vivo*.
4. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi kandungan bahan aktif dari kedua ekstrak tanaman *Mussaenda philippica* ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- ANONIMOUS. 2001a. Traditional Chinese Medicine. tcm: Buddha's Lamp. <http://www.Online.daylight.com.26551/tcm/bio/B157.html>.
- ANONIMOUS. 2001b. Traditional Chinese Medicine. tcm: family Rubiaceae. <http://www.Online.daylight.com.26551/tcm/fam/Rubiaceae.html>.
- DALIMARTHA, S. 1999. *Traditional medicinal herbs for cancer treatment*. Penebar Swadaya. Jakarta (in Indonesian language).
- ENAMI, J., M. KOEYUKA and M. HATA. 1985. Gel strength-dependent branching morphogenesis of mouse mammary tumor cells in collagen gel matrix culture. *Dokyo. J. Med. Sci.* 12: 25-30.

- HARRAN, S., B.P. PRISOERYANTO, F.R. ZAKARIA and L.W. GUNAWAN. 2001. Screening for stable expression of antiviral and anticarcinogenic protein from *in vitro* transformed culture of tropical plants for biomedical uses. Final Report of Team Research Grant Program Batch IV 1998-2000. University Research for Graduate Education (URGE Project). Ditjen Dikti. Depdiknas.
- LIOTTA, L.A., C.N. RAO and S.H. BARSKY. 1983. Tumor invasion and extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49: 636-649.
- MEYER, B.N., N.R. FERRIGNI, J.E. PUTNAM, L.B. JACOBSON, DE. NICHOLS and J.L. MCLAUGHLIN. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
- NABESHIMA, K., H. KATAOKA and M. KONOO. 1986. Enhanced migration of tumor cells in response to collagen degradation product and tumor cell collagenolytic activity. *Invasion and Metastasis* 6: 270-286.
- PRISOERYANTO, B.P. 1994. Morphological and biological studies of tumor in domestic animals. Ph.D dissertation. United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University, Japan.
- PRISOERYANTO, B.P., H. HUMINTO, I W.T. WIBAWAN, S. BAHAGIA, E. ESTUNINGSIH, E. HARLINA dan S. TATEYAMA. 1998b. Penyakit tumor dan kepentingannya pada hewan serta penelitian yang mendasarinya. Abstrak Seminar Ilmiah Bersama Program Studi Sains Veteriner Program Pascasarjana IPB.
- PRISOERYANTO, B.P., I W.T. WIBAWAN dan H. HUMINTO. 1998a. Pendekatan pencegahan dan pengobatan penyakit tumor pada hewan dengan interferon rekombinan (rIFN) dan kombinasinya. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VI/1 Perguruan Tinggi. Dikti-Depdikbud RI.
- PRISOERYANTO, B.P., I-W.T. WIBAWAN dan H. HUMINTO. 2000. Pendekatan pencegahan penyakit tumor pada hewan dengan interferon rekombinan (rIFN) dan kombinasinya. Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing VI 1997-2000. Ditjen Dikti. Depdiknas.
- PRISOERYANTO, B.P., R. SUMARNY, Y. RAHMADINI, G.R.M. NAINGGOLAN, MISWIDIA and S. ANDANI. Growth inhibition effect of plants extracts (*Mussaenda pubescens* and *Curcuma zedoaria*) on tumor cell lines *in vitro*. *DAAD-SEAG Alumni Symposium-cum-Workshop*. SEARCA, Los Banos, The Phillipines 27-31 August 2001.
- PRISOERYANTO, B.P., S. TATEYAMA, R. YAMAGUCHI and K. UCHIDA. 1995a. Establishment of a cell line (MCM-B2) from a benign mixed tumour of canine mammary gland. *Res. Vet. Sci.* 58 : 272-276.
- PRISOERYANTO, B.P., S. TATEYAMA; R. YAMAGUCHI and K. UCHIDA. 1995b. Antiproliferation and colony-forming inhibition activities of recombinant feline interferon (rFeIFN) on various cells *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.* 59: 67-69.
- PRISOERYANTO, B.P., L. RAHAYU, L. SETYORINI and A. MAGDALENA. In vitro anti-proliferation activity of *Impatiens balsamina* plant extracts on two human tumor-derived cell lines. *DAAD-South East Asia German (SEAG) Alumni Symposium-cum-Workshop*. Vietnamese-German Centre at Hanoi Technical University, Hanoi, Vietnam. October 14 8, 2002
- TUMILISAR, C., L.W. GUNAWAN, S. HARRAN and B.P. PRISOERYANTO. 2001. Effects of bioactive protein from *in vitro* hairy roots culture of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *International Seminar on Natural Products Chemistry and Utilization of Natural Resources*. University of Indonesia, Jakarta June 5-7, 2001.
- WIJAYAKUSUMA, H.M.H., S.A. WIRIAN, T. YAPUTRA, S. DALIMARTHA and B. WIBOWO. 1992. Medicinal plants in Indonesia. Vol. II. Pustaka Kartini. Jakarta. (in Indonesian language).
- ZHAO, W., R. XU, G. QIN, T. VAISAR and M.S. LEE. 1996. Saponin from *Mussaenda pubescens*. *Phytochemistry* 42(4): 1131-1134.