

AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS EKSTRAK ETANOL GANGGANG HIJAU (*Spirogyra sp*) DENGAN METODE CAM (*Chorio Allantoic Membrane*)

*Anti-Angiogenic Activity of Ethanolic Extract of Green Algae (*Spirogyra sp*) With Chorio Allantoic Membrane (CAM) Methode*

Wahyu Widyaningsih

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Naskah diterima tanggal 22 September 2013

ABSTRACT

*Angiogenesis plays an important role in tumor growth. Modern treatment of cancer currently has an alternative way to inhibit cancer through antiangiogenesis process. It is expected to inhibit the formation of new blood vessels around the tumor, the supply of nutrients and oxygen by the blood to inhibit tumor growth. This study aims to determine the antiangiogenesis activity of ethanol extract of green algae (*Spirogyra Sp*) by using the method of chorio allantoic membrane (CAM). This study used 7 groups: Group I was a control that content only paper disc, group II contain paper disc + PBS, group III contain paper disc + PBS + bFGF, group IV, V, VI, VII were given 50, 100, 200, 400 µg/mL ethanol extract of green algae respectively. CAM is obtained from embryonated chicken eggs aged 8 days. Afterward incubated for 3 days. The microscopic observation was used to see the inhibitory activity of blood vessels. Statistical analysis used was Kruskal Wallis test to compare each other, continued by Mann Whitney test ($p < 0.05$). The results showed that the ethanol extract of green algae with concentration 50 µg/ml ($p = 0.03$) can inhibit angiogenesis of embryonated chicken eggs compared to bFGF control. In as the conclusion, the ethanol extract of green algae has antiangiogenesis activity in chorio allantoic membrane.*

Keywords : antiangiogenesis, CAM, green algae

ABSTRAK

Angiogenesis berperan penting dalam perkembangan tumor. Saat ini pengobatan kanker memiliki alternatif untuk menghambat kanker melalui proses antiangiogenesis. Diharapkan dengan menghambat pembentukan pembuluh darah baru di sekitar tumor, suplai nutrisi dan oksigen melalui darah ke tumor dapat dihambat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiangiogenesis ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp*) dengan menggunakan metode *chorio allantoic membran* (CAM). Penelitian ini menggunakan 7 kelompok yaitu: kelompok I yaitu kontrol berisi *paper disc*, kelompok II berisi *paper disc* + PBS, kelompok III berisi *paper disc* + PBS + bFGF, kelompok IV, V, VI, VII diberikan masing-masing ekstrak etanol ganggang hijau sebesar 50, 100, 200, 400, µg/mL. CAM diperoleh dari telur ayam berembrio umur 8 hari dan diinkubasi selama 3 hari. Pengamatan dilakukan secara makroskopis untuk melihat aktivitas penghambatan pembuluh darah. Dilanjutkan dengan analisis statistik menggunakan *Kruskal Wallis test* untuk membandingkan nilai signifikansi masing-masing, dilanjutkan dengan *Mann Whitney test* ($p < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol ganggang hijau dengan konsentrasi 50 µg/ml ($p = 0,03$) sudah dapat menghambat angiogenesis pada telur ayam berembrio dibandingkan dengan kontrol bFGF. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol ganggang hijau memiliki aktivitas antiangiogenesis pada *chorio allantoic membrane*.

Kata kunci : antiangiogenesis, CAM, ganggang hijau

PENDAHULUAN

Angiogenesis merupakan pertumbuhan pembuluh darah baru pada jaringan tubuh. Angiogenesis dalam proses fisiologis dapat terjadi pada penyembuhan luka dan perbaikan jaringan tubuh yang rusak. Angiogenesis juga terjadi pada keadaan abnormal

seperti metastasis kanker. Sesungguhnya angiogenesis adalah sebuah proses yang normal, tetapi pada penderita kanker, proses pembentukan pembuluh darah baru ini akan membuat tumor memiliki jaringan pembuluh darah sendiri yang akan membuatnya tumbuh dengan cepat dan ganas (King, 2000). Antiangiogenesis adalah terapi yang bertujuan untuk menghentikan pembentukan pembuluh darah baru, karena tanpa suplai

darah, sel tumor/kanker akan mati. Penghambatan terhadap angiogenesis dapat sebagai terapi alternatif yang perlu dikembangkan karena angiogenesis merupakan salah satu sarana bagi sel kanker untuk tumbuh dan berkembang, dalam proses ini terjadi neovaskularisasi yang memungkinkan kanker mendapat suplai oksigen dan nutrient (Anonim 2007).

Melatonin merupakan senyawa golongan alkaloid dan berkhasiat sebagai penghambat aktivitas kanker (Veronique *et al.*, 2004). Melatonin diproduksi oleh kelenjar pineal di dalam tubuh manusia dan hewan vertebrata. Akan tetapi, produksi melatonin dalam tubuh sangat rendah (dibawah 100 µg) (Lerner *et al.*, 1960). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu adanya asupan melatonin dari luar tubuh guna menghambat aktivitas kanker serta meniadakan efek toksik dari zat-zat epigenetik.

Ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) merupakan tanaman dengan kandungan zat aktif berupa *phytomelatonin* (Kolar dan Machackova, 2001). *Phytomelatonin* adalah senyawa *melatonin* yang terdapat dalam tanaman (*phyto*). Kadar senyawa *phytomelatonin* dalam ganggang hijau sebesar 240 µg/kg berat basah (Kolar dan Machackova, 2001). *Phytomelatonin* dalam ganggang hijau dapat diisolasi dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) (Lerner *et al.*, 1960). Penelitian yang dilakukan Prabowo dkk (2009) diperoleh aktivitas sitotoksik *phytomelatonin* ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar $180,94 \pm 20,96$ µg/mL, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Marini (2010) didapat aktivitas sitotoksik *phytomelatonin* terhadap sel Vero dengan harga IC_{50} sebesar $295,34 \pm 23,86$ µg/mL. Fraksi air ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) mempunyai efek antiangiogenesis dengan metode CAM dengan berbagai variasi konsentrasi (100, 200, 400 dan 800 µg/ml) didapat % penghambatan masing-masing $52,88 \pm 13,46\%$; $64,41 \pm 1,925\%$; $73,07 \pm 0\%$; $82,04 \pm 2,23\%$ (Suryaningrum dan Widyaningsih, 2012). Penelitian ini bertujuan meneliti efek antiangiogenesis ekstrak etanol ganggang hijau sebagai antiangiogenesis sebagai dasar pengembangan ganggang hijau sebagai antiangiogenesis pada terapi kanker.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : timbangan analitik, alat Soxhlet, corong pisah, *mini drill*, bola karet penyedot udara, *laminar air flow*, lampu spiritus, *paper disc* steril, mikrofilter steril, mikropipet, kulkas, pinset, gunting, lup, dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol ganggang hijau yang diperoleh Rowo Jombor, Kabupaten Klaten, *chorio allantoic membrane* (CAM) berasal dari telur ayam *specific pathogen free* (SPF) berumur 8 hari (dalam kondisi terinkubasi). Bahan kimia yang lain adalah etanol 96%,

PBS, larutan antiseptik, pengawet membran CAM, dan aquades.

Prosedur Penelitian Identifikasi Tanaman

Untuk memastikan bahan yang digunakan benar-benar ganggang hijau dilakukan identifikasi tanaman di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Pengumpulan, Pengerinan, dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Pengolahan ganggang hijau untuk menjadi serbuk memerlukan beberapa tahapan. Tahapan tersebut adalah : 1) ganggang hijau dibersihkan dari kotoran dengan pencucian menggunakan air mengalir. 2) ganggang dimasukkan ke dalam wadah berisi air dan didiamkan selama satu hari (12 jam fase penyinaran dan 12 jam fase penggelapan). 3) ganggang diambil dari wadah pada 5 jam setelah dimulai fase penggelapan dan dipotong-potong dengan ketebalan 1-5 mm. 4) potongan-potongan tersebut dijemur hingga kering di bawah sinar matahari dengan ditutupi oleh kain hitam. Penutupan kain hitam dimaksudkan untuk mempercepat proses pengeringan karena kain hitam dapat menyerap panas dan juga untuk menghindari kerusakan zat aktif akibat dari sinar UV matahari. 5) ganggang kering kemudian diserbukkan dengan menggunakan *blander*. Proses penyerbukkan dapat meningkatkan luas permukaan antara simplisia dengan larutan penyari. Hal ini dapat meningkatkan jumlah zat aktif yang tersari ke dalam ekstrak.

Pembuatan ekstraksi ganggang hijau

Ganggang hijau yang sudah dalam bentuk serbuk dilakukan ekstraksi dengan beberapa tahapan, yaitu : 1) Serbuk ganggang hijau diekstraksi dengan etanol 96% dengan metode Soxhlet. 2) Sari etanol ganggang hijau kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Uji Antiangiogenesis Sterilisasi alat.

Alat-alat yang akan digunakan untuk uji antiangiogenesis disterilkan dengan pemanasan basah dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15-30 menit.

Preparasi bFGF

Sebagai induktor angiogenesis. *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) yang digunakan sebanyak 25 µg, dibuat stok kadar 50 ng/µL menggunakan larutan Tris-HCl 10 mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga diperoleh larutan dengan kadar 0,5 ng/µL. Preparasi bFGF dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Dosis bFGF yang diberikan untuk setiap telur perlakuan terinduksi adalah 10 ng (Sun dkk, 2004).

Preparasi sediaan larutan uji.

Ekstrak etanol ganggang hijau dilarutkan dengan PBS steril untuk kemudian dibuat seri

konsentrasi. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan mikrofilter.

Uji daya hambat angiogenesis.

Telur SPF berembrio yang telah berumur 8 hari (inkubasi diinkubasi pada suhu 39°C). Telur dengan embrio diperiksa dengan menggunakan teropong telur dan tandai daerah batas ruang udara, lokasi embrio, dan daerah yang bebas dari pembuluh darah yang akan dibuat jendela berukuran 1x1 cm di atas embrio dan diberi larutan iodium. Dengan alat penusuk/bor telur, dibuat lubang pada cangkang di daerah batas ruang udara dan pada daerah di salah satu sisi yang bebas dari pembuluh darah sesuai dengan tanda sebelumnya. Udara dari ruang udara alami dikeluarkan perlahan-lahan dengan menghisap dari bola karet (*rubber teat*). Perlakuan ekstrak dan bahan-bahan uji lain dimasukkan dalam sebuah *paper disc* menggunakan mikropipet. Lubang yang terdapat pada cangkang ditutup dengan parafin cair kemudian diinkubasi pada temperatur 37-40°C pada posisi horizontal.

Pengelompokan Perlakuan :

Telur dibagi 7 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 3 telur). Kelompok I adalah telur dengan implantasi *paper disc*, sebagai kontrol *paper disc*. Kelompok II kelompok telur terinduksi adalah telur dengan implantasi *paper disc* termuati PBS 10 µL. Kelompok III kelompok kontrol bFGF + pelarut adalah kelompok telur dengan implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng + pelarut PBS sebanyak 10 µL. Kelompok IV, V, VI, VII merupakan telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak etanol ganggang hijau terhadap angiogenesis CAM dengan kadar. Telur pada kelompok ini diberi implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng dan ekstrak etanol ganggang hijau dengan kadar 50, 100, 200, 400 µg/mL. Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 37-40°C dan kelembaban relatif 60% selama 3 hari atau 72 jam (Ribatti dkk, 1997). Pada hari ke-3 inkubasi telur (umurnya 12 hari) dibuka dan membran *korio alantois* yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik.

Analisis Data

Evaluasi uji antiangiogenesis secara makroskopi dilakukan pembentukan pembuluh darah baru yang terbentuk pada dan di sekitar *paper disc*. Pembuluh darah utama/asal pada CAM mempunyai ukuran yang lebih besar, sedangkan pembuluh darah baru merupakan pembuluh darah yang lebih halus/kecil (Ribatti dkk, 1999). Jumlah pembuluh darah baru dapat dihitung % penghambatannya, kemudian dianalisis statistik dengan menggunakan metode Kruskal Wallis dan Mann Whitney ($p < 0,05$).

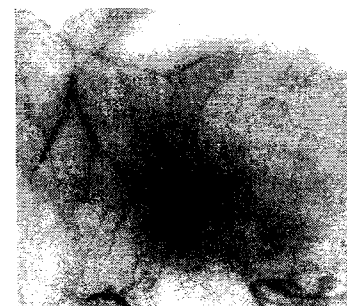
X 100 %

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{Pembuluh darah baru kontrol bFGF} - \text{Pembuluh darah baru Perlakuan}}{\text{Pembuluh darah baru kontrol bFGF}} \times 100 \%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

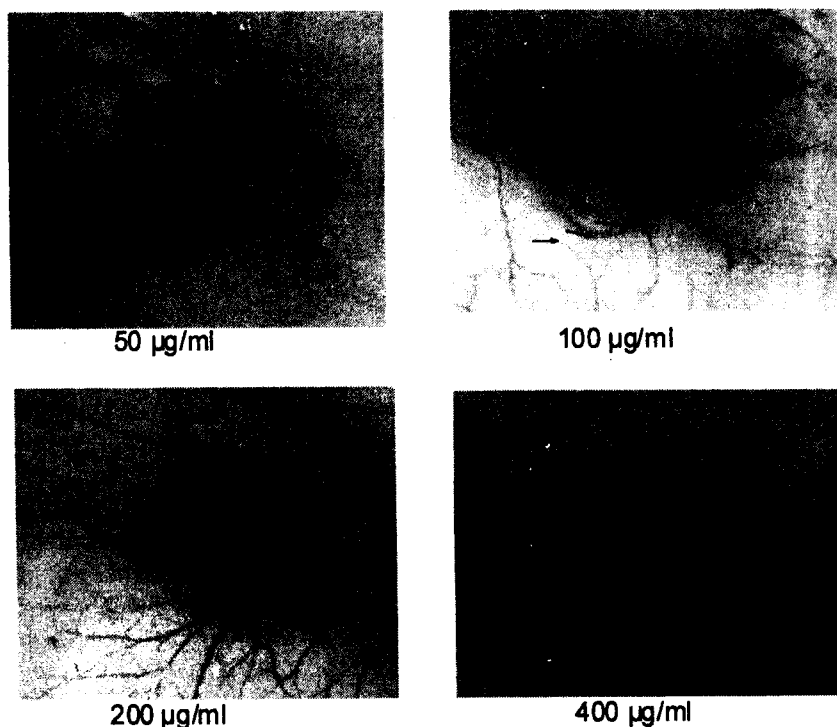
Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh

darah yang telah ada. Pembentukan pembuluh darah ini terjadi baik karena efek fisiologis maupun efek patologis, salah satunya terjadi pada sel kanker. Sel kanker mengeluarkan bFGF untuk membentuk pembuluh darah baru, sehingga penelitian dikondisikan seperti pada sel kanker. Hasil pengamatan pada kelompok kontrol *paper disc* + pelarut PBS + bFGF menunjukkan adanya peningkatan jumlah pembuluh darah baru yang banyak sekali di daerah sekeliling *paper disc*, sehingga dapat dikatakan adanya efek angiogenesis. Pembuluh darah baru terbentuk dengan pola radial menuju kearah *paper disc* (diameter 1,5 cm), sehingga tampak jelas bahwa pemberian bFGF benar-benar menginduksi terjadinya angiogenesis pada CAM. Sedangkan pada kelompok kontrol *paper disc* + pelarut PBS menunjukkan hasil yang sama dengan kelompok kontrol yang hanya diberi oleh *paper disc* saja, yaitu tidak terdapat peningkatan pembentukan pembuluh darah baru seperti pada kelompok kontrol *paper disc* + pelarut PBS + bFGF. Perbedaan penampakan ketiga kelompok kontrol secara makroskopi/visual dapat dilihat pada gambar 1.



(1). *Paper disc* (2). Pelarut PBS (3). bFGF

Gambar 1. Pengamatan makroskopi CAM pada kelompok kontrol



Gambar 2. Pengamatan makroskopi CAM yang terinduksi bFGF pada kelompok perlakuan senyawa uji dengan variasi konsentrasi.

Pengamatan antiangiogenesis dilakukan dengan menghitung jumlah pertumbuhan pembuluh darah baru pada kelompok perlakuan ekstrak etanol ganggang hijau yang dibandingkan dengan kelompok kontrol *paper disc* + pelarut PBS + bFGF. Pengamatan makroskopi menunjukkan bahwa ekstrak etanol ganggang hijau mampu menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru

atau angiogenesis pada CAM yang diinduksi oleh bFGF. Hasil uji angiogenesis ekstrak etanol ganggang hijau menunjukkan semakin tinggi kadar, semakin tinggi pula penghambatan angiogenesis yang terjadi pada CAM yang terinduksi bFGF ditandai dengan terjadinya penurunan jumlah pembuluh darah baru. Pertumbuhan pembuluh darah baru ini mengalami

Tabel I. Rata-rata jumlah pembuluh darah baru pada kelompok kontrol maupun kelompok yang diberi ekstrak etanol ganggang hijau

Perlakuan	Jumlah Pembuluh Darah Baru ($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol paper disc	0,00 \pm 0,00
Kontrol PBS	0,00 \pm 0,00
Kontrol bFGF	26,00 \pm 0,00
Ekstrak etanol ganggang hijau 50 μ g/ml	10,00 \pm 0,00
Ekstrak etanol ganggang hijau 100 μ g/ml	7,67 \pm 0,58
Ekstrak etanol ganggang hijau 200 μ g/ml	8,00 \pm 0,00
Ekstrak etanol ganggang hijau 400 μ g/ml	3,50 \pm 0,50

Tabel II. Harga % (persen) penghambatan ekstrak etanol Ganggang hijau

Perlakuan	% penghambatan ($\bar{X} \pm SD$)
Ekstrak etanol ganggang hijau 50 μ g/ml	61,0 \pm 0,00
Ekstrak etanol ganggang hijau 100 μ g/ml	70,8 \pm 5,85
Ekstrak etanol ganggang hijau 200 μ g/ml	72,7 \pm 4,04
Ekstrak etanol ganggang hijau 400 μ g/ml	86,5 \pm 2,20

Tabel III. Ringkasan analisis statistik jumlah pembuluh darah baru antar kelompok perlakuan dengan *Mann-Whitney* test.

Sumber Variasi	Kontrol paper disc	kontrol PBS	kontrol bFGF	Ekstrak 50 µg/ml	Ekstrak 100 µg/ml	Ekstrak 200 µg/ml	Ekstrak 400 µg/ml
kontrol PBS	TS (p=1,000)						
kontrol bFGF	S (p=0,025)	S (p=0,025)					
Ekstrak 50 µg/ml	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,034)				
Ekstrak 100 µg/ml	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,043)			
Ekstrak 200 µg/ml	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,043)		
Ekstrak 400 µg/ml	S (p=0,025)	S (p=0,025)	S (p=0,025)	S (p=0,034)	S (p=0,034)	S (p=0,034)	

Keterangan : S = Berbeda signifikan/Berbeda Bermakna
 TS = Berbeda Tidak Signifikan/Berbeda Tidak Bermakna

pengurangan pada konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/mL. Gambaran pertumbuhan pembuluh darah baru pada kelompok uji ekstrak etanol tersaji pada gambar 2.

Hasil perhitungan jumlah rata-rata pembuluh darah pada masing-masing kelompok kontrol maupun kelompok yang diberi ekstrak etanol ganggang hijau dapat dilihat pada Tabel I.

Kemampuan menghambat pembentukan pembuluh darah baru setelah pemberian bFGF ditunjukkan dengan cara menghitung persen penghambatan (Tabel II).

Berdasarkan hasil analisis statistik dapat disimpulkan bahwa kontrol *paper disc* dan kontrol pelarut PBS tidak memberikan efek pembentukan pembuluh darah baru karena nilai signifikansi yang diperoleh berbeda tidak bermakna, berbeda jika dibandingkan dengan kontrol bFGF yang nilai signifikansinya berbeda bermakna, hal ini dikarenakan pada kelompok bFGF sudah terdapat pembentukan pembuluh darah baru. Pada ekstrak etanol ganggang hijau dengan variasi konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/mL menunjukkan hasil signifikansi berbeda bermakna dengan kontrol bFGF yang artinya sudah dapat memberikan efek sebagai antiangiogenesis. Hal ini berbanding lurus dengan penghambatan pertumbuhan jumlah pembuluh darah baru pada setiap tingkatan variasi konsentrasi dari ekstrak etanol ganggang hijau. Pada penelitian ini, pemberian ekstrak etanol ganggang hijau terbukti mampu menghambat pembentukan

pembuluh darah baru. Penghambatan tersebut dimungkinkan karena adanya senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol ganggang hijau yang mempunyai aktivitas sebagai inhibitor angiogenesis.

Angiogenesis yang diteliti pada penelitian ini bukan angiogenesis kanker tapi angiogenesis normal. Angiogenesis normal tersebut dapat dianalogikan dengan mekanisme angiogenesis pada kanker, karena kanker juga mengekspresikan suatu *growth factor* seperti bFGF. Angiogenesis merupakan pembentukan cabang baru pembuluh darah menuju sel kanker yang akan menyuplai kebutuhan nutrisi dan oksigen sel kanker. Angiogenesis memungkinkan sel mendapat suplai nutrisi dan oksigen sehingga dapat terus bertahan hidup. Beberapa sel memproduksi faktor-faktor pertumbuhan yang dapat menginduksi terjadinya angiogenesis seperti *basic fibroblast growth factor* (bFGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Sehingga sel kanker tersebut akan berkembang biak menjadi masa yang besar (Hanahan dan Weinberg, 2000).

Mekanisme yang terjadi pada pelepasan bFGF sebagai *growth factor*, yaitu bFGF berinteraksi dengan sel endothelial melalui reseptor tirosin kinase dan reseptor *heparin sulfate proteoglycan* (HSPGs) di permukaan sel. Keseimbangan antara penyimpanan dan pelepasan bFGF di matriks ekstra selular mungkin adalah suatu pengaturan efek biologi dari faktor pertumbuhan ini di endothelium (Sugiyanto, 2009). Untuk melakukan penghambatan angiogenesis,

penetralkan terhadap bFGF sudah cukup untuk mengganggu proses keseimbangan angiogenesis dan mengarah pada penghambatannya.

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak etanol ganggang hijau mampu menghambat angiogenesis meski belum bisa dipastikan mengenai mekanisme aksi penghambatannya. Adapun senyawa aktif yang diduga berperan sebagai antiangiogenesis adalah *Phytomelatonin*, kemungkinan mekanisme penghambatan dapat melalui berbagai cara yaitu dengan menghambat proliferasi sel endothelia melalui *growth factor*, menghambat invasi sel dengan anti integrin inhibitor, mencegah invasi sel endothelia pada sel kanker melalui inhibitor *metalloproteinase* (MMPs) dan dengan meningkatkan konsentrasi inhibitor endogen seperti endostatin (King, 2000).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Ekstrak etanol ganggang hijau (*Spyrogra* Sp) memiliki aktivitas antiangiogenesis.
2. Ekstrak etanol ganggang hijau mampu menghambat pembentukan pembuluh darah baru pada konsentrasi 50, 100, 200, 400 µg/mL.

Saran

1. Dilakukan uji antiangiogenesis isolat phytomelatonin dari ganggang hijau
2. Dilakukan penelitian dengan implantasi jaringan implant tumor untuk menginduksi angiogenesis pada model CAM.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2007, *Anti-angiogenesis: Kanker Mati Kelaparan*, <http://rumahkanker.com/Anti-angiogenesis: Kanker Mati Kelaparan> (diakses bulan Juli 2008).
- Bosman, FT. 1999. Aspek-aspek Fundamental kanker, In Van Der Velde, C.J.H. Bosman, FT., Wagner D.J.,(Eds), *Onkologi*, diterjemahkan oleh Arjuno Ed, V 3-35 Panitia Kanker RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. *The Hallmark of Cancer, Cell*, 100: 57-70.
- King. R. J. B. 2000. *Cancer Biology*, School of Biological Sciences, University of surrey, Pearson Ed
- Kolar J, Machanckova. 2001. *Occurance and possible function of melatonin in plants, Endocytobiosis and Cell Res* 14 (1) : 75-84.
- Lerner, A., James, D.C., Yoshiyata, T. 1960. *Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands, The Journal of Biological Chemistry* 235 (7) : 1992-1997.
- Marini, L. 2010. Uji Sitotoksitas *Phytomelatonin* Ganggang hijau (*Spirogyra* sp.) Terhadap sel Vero secara In Vitro, Skripsi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Prabowo, A. 2009. Pemanfaatan *Phytomelatonin* Ganggang hijau (*Spirogyra* sp.) Sebagai *Cancer Activity* Inhibitor dari Induksi Logam Berat, PKM, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.