

Perbandingan Aktivitas Penghambatan Sel Kanker Payudara Fraksi Aseton dan Etil Asetat Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao*)

Hartanti¹, Iwan Sariyanto²

¹ Program Studi Sarjana Terapan Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang

² Program Studi D III Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang

Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering didiagnosis di kalangan wanita, berdampak pada 2,1 juta wanita setiap tahunnya. Kemoterapi masih menjadi penanganan utama kanker payudara. Akan tetapi kemoterapi memiliki efek samping berbahaya bagi sel-sel normal. Oleh karena itu, masih diperlukan senyawa baru dengan potensi terapeutik yang lebih baik dan efek samping yang lebih rendah. Penelitian ini menggunakan kulit coklat sebagai kandidat penemuan senyawa obat kanker payudara. Tujuan penelitian ini untuk membandingkan fraksi aseton dan etil asetat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi cair-cair. Uji aktivitas antikanker MCF-7 dilakukan dengan metode *MTT assay* menggunakan sel kanker payudara MCF-7 (ATCC HTB 22). Hasil penelitian menunjukkan bahwa Fraksi etil asetat memiliki kemampuan penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi aseton. Nilai penghambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 tertinggi pada fraksi etil asetat diperoleh pada konsentrasi 50 µg/mL, yaitu 14,13%. Sedangkan, pada konsentrasi yang sama nilai persen inhibisi fraksi etanol hanya 7,9%. Berdasarkan nilai IC_{50} , baik fraksi aseton maupun etil asetat kulit coklat memiliki aktivitas antikanker yang tergolong lemah. Perlu dilakukan optimasi metode ekstraksi untuk mendapatkan nilai IC_{50} yang lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7

Kata Kunci : MCF-7, Kulit Coklat, CPH

Comparison of Breast Cancer Cell Inhibition Activity of Acetone and Ethyl Acetate Fractions from Cocoa Pod Husk (*Theobroma cacao*)

Abstract

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among women, affecting 2.1 million women each year. Chemotherapy remains the primary treatment for breast cancer; however, it has harmful side effects on normal cells. Therefore, new compounds with better therapeutic potential and fewer side effects are still needed. This study uses cocoa peel as a candidate for the discovery of breast cancer drug compounds. This study aims to compare the acetone and ethyl acetate fractions in inhibiting the growth of MCF-7 breast cancer cells. The extraction method used is maceration followed by liquid-liquid fractionation. The anti-cancer activity test on MCF-7 cells was carried out using the *MTT assay* method with MCF-7 breast cancer cells (ATCC HTB 22). The results showed that the ethyl acetate fraction had a higher ability to inhibit the growth of MCF-7 breast cancer cells than the acetone fraction. The highest growth inhibition of MCF-7 cells in the ethyl acetate fraction was obtained at a concentration of 50 µg/mL, which was 14.13%. In comparison, at the same concentration, the inhibition percentage of the ethanol fraction was only 7.9%. Based on the IC_{50} values, the acetone and ethyl acetate fractions of cocoa peel have weak anti-cancer activity. Optimization of the extraction method is needed to obtain a more optimal IC_{50} value in inhibiting the growth of MCF-7 breast cancer cells.

Keywords : MCF-7, cocoa pod husk, CPH

Korespondensi: Hartanti, SSi., MSi Prodi Sarjana Terapan, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, Jalan Soekarno-Hatta No. 1 Hajimena Bandar Lampung, *mobile* 085714890697, *e-mail* hartanti@poltekkes-tjk.ac.id

Pendahuluan

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak terjadi pada wanita. Kanker ini menyebabkan kematian dan kecacatan dengan kasus 523.000 kematian dan 15,1 juta hidup dengan disabilitas. Kanker payudara dipengaruhi oleh faktor hormonal, seperti usia, kesuburan, usia saat pertama melahirkan, menyusui, dan terapi hormon (Yahya *et al.* 2021). Terdapat beberapa metode yang digunakan dalam pengobatan dan terapi kanker payudara, yaitu pembedahan tumor, radioterapi, imunoterapi, kemoterapi, vaksinasi kanker, terapi fotodinamik, dan transformasi stem sel. Metode pengobatan tersebut menimbulkan beberapa efek samping bagi penderita, diantaranya adalah pengobatan bersifat toksik bagi sel normal, keterbatasan bioavailabilitas, efek obat tidak spesifik pada sel kanker, dan menimbulkan resistensi obat (Nsor-Atind *et al.* 2012; Kumari *et al.* 2016). Berbagai efek samping dan keterbatasan tersebut menyebabkan perlu dilakukannya pencarian obat anti kanker yang bersumber dari bahan alami.

Selama beberapa dekade terakhir, telah banyak laporan mengenai senyawa metabolit sekunder yang berasal dari tanaman yang memiliki aktivitas antikanker. Kandungan fitokimia dari tanaman obat dapat menghambat dan mematikan pertumbuhan sel kanker (Manye *et al.* 2023). Salah satu sumber bahan alam yang mulai banyak diteliti adalah kandungan kulit buah coklat yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker, antara lain sel kanker kolon dan sel kanker payudara MCF-7 (Baharum *et al.* 2014; Indrianingsih *et al.* 2021; Belwal *et al.* 2022). Aktivitas antikanker tersebut disebabkan adanya kandungan senyawa fenolik dan flavonoid (Hidayah *et al.* 2022). Potensi senyawa antikanker payudara yang terkandung dalam kulit buah coklat dapat terus dikembangkan. Kedepannya diharapkan dapat menjadi alternatif pengobatan yang aman tanpa efek samping. Penelitian yang telah ada sejauh ini masih menguji aktivitas antikanker payudara MCF-7 hanya pada ekstrak kasar saja dan belum ada yang melakukan penelitian mengenai korelasi antara aktivitas anti kanker kulit buah coklat dengan kandungan metabolitnya.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka permasalahan yang diteliti dalam penelitian ini adalah bagaimana aktivitas anti kanker payudara MCF-7 antara fraksi etil asetat

dan fraksi aseton. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi penelitian dasar untuk pengembangan senyawa antikanker dari kulit buah coklat yang kedepannya dapat memberikan manfaat untuk pengobatan kanker payudara tanpa efek samping. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan fraksi aseton dan etil asetat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

Metode

Penelitian ini berjenis eksperimental dengan menggunakan Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao* L. Pod Husk) sebagai sampel penelitian. Perlakuan yang digunakan sebanyak 5 konsentrasi dengan tiga kali pengulangan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September-November 2023. Ekstraksi dan fraksinasi dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Lampung, sedangkan uji aktivitas antikanker payudara dilakukan di Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB.

Sampel kulit buah coklat yang diperoleh dari wilayah Lampung Barat, Provinsi Lampung. Sel Kanker Payudara MCF-7 (ATCC HTB 22) yang digunakan merupakan koleksi Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB. Kulit buah coklat yang digunakan adalah sisa panen biji coklat yang sudah tidak dimanfaatkan. Sampel dibersihkan dengan air mengalir, kemudian di potong-potong untuk selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 hari. Setelah dikeringkan, sampel di haluskan dan diestraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 selama 3 hari. Ekstrak kasar metanol yang diperoleh, kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat dan aseton. Fraksinasi dilakukan dengan metode cair-cair (1:1).

Sel MCF-7 (ATCC HTB 22) ditumbuhkan dengan konsentrasi 5000 sel dalam 100 µL media penumbuh (RPMI 1640) yang disuplementasi dengan Fetal Bovine Serum (FBS) 10% dan Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL). Ekstrak ditambahkan setelah sel konfluen 50% (24 jam). Uji MTT dilakukan pada hari ke 3, dengan menambahkan MTI (5 mg/mL) sebanyak 10 µL per sumur dengan masing-masing konsentrasi sampel 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL, kemudian diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C. Kristal formazan dilarutkan dalam etanol. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm.

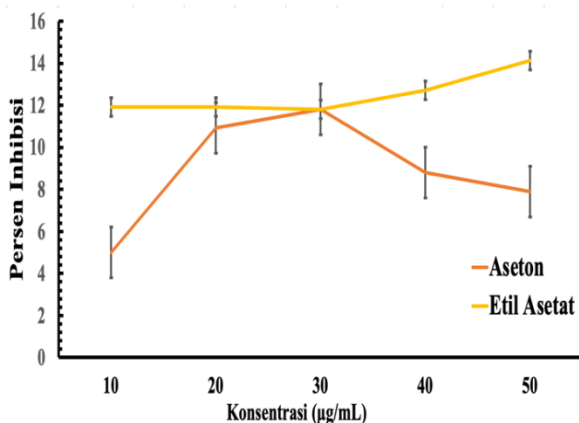
Hasil

Uji aktivitas antikanker payudara fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat dinyatakan dalam persen inhibisi, yaitu kemampuan fraksi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh rata-rata persen penghambatan pada masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rerata Persen Inhibisi pada Setiap Konsentrasi Uji

Konsentrasi (µg/mL)	Rerata Persen Inhibisi	
	Aseton	Etil Asetat
10	5,00	11,92
20	10,93	11,92
30	11,80	11,81
40	8,81	12,72
50	7,90	14,13

Berdasarkan Tabel di atas terlihat bahwa fraksi etil asetat kulit coklat memiliki rerata kenaikan nilai penghambatan sebanding dengan meningkatnya konsentrasi larutan uji. Hal tersebut berbeda dengan nilai rerata persen inhibisi pada fraksi aseton yang memiliki pola data tidak linier terhadap kenaikan konsentrasi larutan uji. Perbandingan rerata persen inhibisi antara fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat dapat dilihat pada Gambar 1.

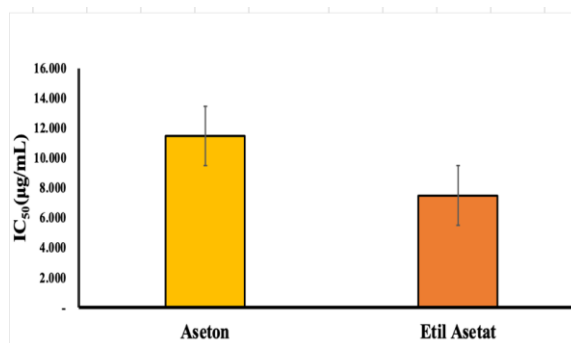


Gambar 1. Persen inhibisi fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat terhadap pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

Fraksi etil asetat memiliki rata-rata persen inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi aseton. Pada konsentrasi terendah, yaitu 10 µg/mL, fraksi etil asetat sudah mampu menghambat pertumbuhan sel

kanker sebesar 11,92%, sedangkan pada fraksi aseton hanya 5µg/mL. Nilai penghambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 tertinggi pada fraksi etil asetat diperoleh pada konsentrasi 50 µg/mL, yaitu 14,13%. Sedangkan, pada konsentrasi yang sama nilai persen inhibisi fraksi etanol hanya 7,9%. Tidak adanya aktivitas penghambatan (persen inhibisi nol) pada sel kontrol (sel tanpa perlakuan fraksi) menandakan bahwa penghambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 pada setiap konsentrasi disebabkan oleh penambahan fraksi aseton maupun etil asetat.

Penelitian ini juga menentukan nilai IC_{50} (Inhibition Concentration 50), yaitu konsentrasi fraksi aseton dan etil asetat yang dapat menghambat 50% pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi kemampuan fraksi tersebut dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Nilai IC_{50} untuk kedua fraksi disajikan pada Gambar 2. Fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan dengan fraksi aseton. Nilai IC_{50} untuk fraksi aseton dan etil asetat berturut-turut sebesar $11,4 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ dan $7,4 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan nilai IC_{50} , baik fraksi aseton maupun etil asetat kulit coklat memiliki aktivitas antikanker yang tergolong lemah.



Gambar 2. Perbandingan nilai IC_{50} fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat.

Pembahasan

Penelitian ini menggunakan fraksi aseton dan etil asetat dari ekstrak kasar metanol. Hal ini didasarkan pada penelitian Yahya *et al.* (2022), yang menghasilkan bahwa ekstrak kasar metanol memiliki aktivitas antikanker yang tergolong kuat, dengan nilai persen inhibisi sebesar 97,62%. Oleh karena itu, untuk meningkatkan aktivitas antikankernya, maka dilakukan fraksinasi dari ekstrak kasar metanol. Fraksinasi bertujuan memisahkan senyawa aktif berdasarkan kepolaran pelarut.

Uji aktivitas antikanker fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat terhadap sel kanker payudara MCF-7 (ATCC HTB 22) dilakukan dengan metode MTT assay. Uji MTT ini merupakan metode umum yang digunakan untuk menentukan aktivitas antikanker suatu senyawa (Zainal *et al.*2014). Prinsip metode ini dengan mereduksi garam tetrazolium MTT ((3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida) oleh enzim suksinat reduktase dalam mitokondria sel yang masih hidup akan menghasilkan kristal formazan berwarna ungu. Penambahan SDS dalam HCl akan melarutkan kristal formazan berwarna ungu tersebut sehingga absorbansinya dapat diukur menggunakan ELISA reader (Zainal *et al.*2014)

Hasil uji aktivitas antikanker pada penelitian ini dinyatakan dalam kurva persen inhibisi yang di plotkan dengan konsentrasi fraksi kulit coklat yang di ujikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada fraksi aseton nilai rerata persen inhibisi tidak linier seiring dengan peningkatan konsentrasi larutan uji. Hal ini mungkin terjadi karena kandungan metabolit sekunder yang berperan terhadap penghambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 pada fraksi ini proporsinya tidak sama pada setiap konsentrasi. Sehingga memungkinkan konsentrasi yang lebih rendah mengandung lebih banyak komponen zat aktif yang menghambat pertumbuhan sel kanker.

Rerata penghambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 pada fraksi etil asetat menghasilkan nilai linearitas yang lebih baik. Hal ini terlihat semakin tinggi konsentrasi, nilai penghambatan semakin meningkat, kecuali pada konsentrasi 30 µg/mL. Pada konsentrasi tersebut dimungkinkan komponen zat aktif penghambat sel kanker lebih rendah dibandingkan konsentrasi di 20 µg/mL, yang memiliki rerata penghambatan lebih tinggi.

Berdasarkan nilai persen inhibisi diketahui bahwa fraksi etil asetat memiliki kemampuan lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi aseton dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Hal ini sejalan dengan hasil perhitungan nilai IC₅₀ kedua fraksi tersebut, dimana fraksi etil asetat kulit coklat memiliki nilai IC₅₀ yang lebih rendah dibandingkan dengan fraksi aseton.

Kemampuan fraksi etil asetat kulit coklat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 diduga berhubungan dengan kandungan total fenolik dalam kedua fraksi tersebut. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa kandungan senyawa fenolik

fraksi etil asetat kulit coklat lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi aseton (Hartanti & Sariyanto 2023). Beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa fenolik pada kulit coklat berperan dalam kemampuan suatu senyawa sebagai antikanker, inflamasi, penyakit kardiovaskular, dan beberapa penyakit degeneratif.

Kemampuan antikanker suatu ekstrak berhubungan dengan kandungan senyawa metabolit sekundernya. Berdasarkan penelitian sebelumnya, hasil analisis GC-MS senyawa metabolit pada fraksi etil asetat dan fraksi aseton diketahui bahwa fraksi etil asetat mengandung lebih banyak senyawa yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker, diantaranya adalah myristicine, Isoelemicin, hexadecanoic acid, Ethyl P-Methoxycinnamate, 1,2-Propanediol, 3-chloro-, 1,2- Propanediol, 3-chloro-, N-Hydroxymethylacetamide, Eugenol, Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl), 9,12-Octadecanoic acid, methyl ester, E-3,3-Dimethoxy-4,4-dihydroxystilbene, Benzene, 1, 2-dimethoxy-4-(1-propenyl)-, dan piperine (Hartanti & Sariyanto 2023). Myristicine dan Isoelemicin merupakan senyawa yang dapat menghambat proliferasi sel kanker melalui stimulasi jalur Caspase-3 (Rachmawati *et al.* 2018). Senyawa n-Hexadecanoic acid diketahui memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker melalui interkasinya dengan enzim topoisomerase 1 (Ravi Khrisnan 2017).

Ethyl P-Methoxycinnamate diketahui sebagai agen Anti-Metastasis Aktif (Lallo *et al.* 2022). Selain itu berdasarkan beberapa literature bahwa 1,2-Propanediol, 3-chloro-, 1,2- Propanediol, 3-chloro-, N-Hydroxymethylacetamide, Eugenol, Phenol, 2, 6-dimethoxy-4-(2-propenyl), 9, 12-Octadecanoic acid, methyl ester, E-3,3-Dimethoxy-4,4-dihydroxystilbene, Benzene, 1, 2-dimethoxy-4-(1-propenyl)-, dan piperine sebagai senyawa antikanker (Begum *et al.* 2022; Aziz *et al.* 2019; Ok Ban *et al.* 2007; Rather & Bhagat 2018). Senyawa Theobromine merupakan senyawa khas yang terkandung dalam tanaman coklat termasuk bagian buah dan kulit coklat. Senyawa ini hanya teridentifikasi dalam fraksi aseton. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antikanker (Cadona *et al.*2020).

Nilai IC₅₀ fraksi etil asetat pada penelitian ini memiliki nilai IC₅₀ > 1000. Sitotoksitas suatu ekstrak berdasarkan nilai IC₅₀ digolongkan menjadi 3 yaitu: sitotoksitas potensial (IC₅₀ < 100 µg/L), sitotoksitas sedang (IC₅₀ < 1000 µg/L) dan rendah (IC₅₀ >

1000 µg/L) (Prayong, 2008). Dengan demikian, berdasarkan pengelompokan tersebut, kemampuan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dari fraksi etil asetat kulit coklat pada penelitian ini masih tergolong rendah. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya adalah terlalu rendahnya konsentrasi larutan uji dari fraksi etil asetat dan aseton kulit coklat yang digunakan. Peningkatan konsentrasi larutan uji berpengaruh nyata terhadap peningkatan kemampuan senyawa sebagai antikanker. Berdasarkan penelitian Yahya *et al* (2020), diketahui bahwa ekstrak kasar metanol memiliki kenaikan persen penghambatan dari yang semula 28,35% pada konsentrasi 125 µg/mL menjadi 97,65% setelah konsentrasinya dinaikkan menjadi 250 µg/mL. Selain itu, rendahkan aktivitas antikanker pada fraksi aseton dan etil asetat kulit coklat mungkin juga disebabkan oleh kurang optimalnya metode ekstraksi yang digunakan, ukuran sampel, waktu ekstraksi, dan penyimpanan sampel. Quiroz-Reyes *et al.* (2013) melaporkan bahwa ekstraksi dengan metode ultrasonic radiasi dapat mengoptimalkan penarikan senyawa polifenol dalam kulit coklat. Sementara Mellinas *et al* 2020, menemukan bahwa metode ekstraksi kulit coklat dengan microwave-assisted extraction (MAE) dapat menghasilkan kandungan senyawa antioksidan tertinggi dibandingkan dengan maserasi (metode soxhletasi).

Simpulan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat kulit coklat memiliki aktivitas penghambatan sel kanker payudara MCF-7 lebih besar dibandingkan dengan fraksi aseton. Aktivitas antikanker fraksi etil asetat masih tergolong rendah. Dengan demikian perlu dilakukan beberapa optimasi seperti optimasi metode ekstraksi dan fraksinasi. Disarankan untuk penelitian selanjutnya dapat menggunakan konsentrasi larutan uji yang lebih tinggi dan dapat menggunakan metode ekstraksi yang berbeda guna mengoptimalkan kemampuan fraksi etil asetat kulit coklat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

Daftar Pustaka

Aziz, A., Hanif, F., Majeed, S., Iftikhar, K., Simjee, S.U. (2019). N-(2-hydroxyphenyl) acetamide (NA-2) elicits potent antitumor effect against human breast cancer cell line (MCF-7).

Toxicology *in*
Vitro.doi:10.1016/j.tiv.2019.06.011

- Baharum *et al.* 2014. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of *Theobroma cacao*. *Molecules* 2014(19): 1831718331.doi:10.3390/molecules191118317.
- Begum *et al.* 2022. A comprehensive and systematic review on potential anticancer activities of eugenol: From pre-clinical evidence to molecular mechanisms of action. *Phytomedicine*.107(2022): 154456
- Belwal *et al.* 2022. Bioactive Compounds from Cocoa Husk: Extraction, Analysis and Applications in Food Production Chain. *Foods*. 11(6):2022.
- Cadona *et al.* 2020. Chapter 2 - Natural product-based nanomedicine: polymeric nanoparticles as delivery cargoes of food bioactives and nutraceuticals for anticancer purposes. *Academic Press*. 2020: 37-67.
- Hartanti, Sariyanto I. 2023. Comparative analysis of total flavonoid, total phenolic content, and antioxidant activity of *Theobroma cacao* Pod Husk extract and its derived fractions. *GSC Biological and Pharmaceutical Science*. 25(03), 159–166.
- Hidayah *et al.* 2022. Determination of Total Phenolic, Total Flavonoid, and Antioxidant Activity of India Onion Extract. *Indo. J. Chem.Sci*. 11(2):2022
- Indrianingsih *et al.* 2021. In vitro studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao*, *Annona muricata* and *Clitoria ternatea*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.2021:33.
- Lallo *et al.* 2022. P-Methoxycinnamate: An Active Anti-Metastasis Agent and Chemosensitizer Targeting NFκB from *Kaempferia galanga* for Melanoma Cells. *Life*.12(337): 2022. <https://doi.org/10.3390/life12030337>

- Lesmana *et al.* 2022. Potential Molecular Interaction of Nutmeg's (*Myristica fragrans*) Active Compound via Activation of Caspase-3. *Indonesian Journal of Science & Technology*. 7(1):159-170.
- Manye *et al.* 2023. Phytochemical screening and *in-vitro* antioxidant activities of aqueous and methanol extracts of *Aloe vera*. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*.8(2023):100291.
- Mellinas A.C., Jiménez A, Garrigós M.C. 2020. Optimization of microwave-assisted extraction of cocoa bean shell waste and evaluation of its antioxidant, physicochemical and functional properties. *Food Science and Technology*. 2020
- Nsor-Atind *et al.*, 2012. Antioxidant Action of *Moringa oleifera* Lam. (Drumstick) Against Antitubercular Drugs Induced Lipid Peroxidation in Rats. *Journal of Medicinal Food*.2003:255259.
- Ok Ban *et al.* 2007. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in Human Colon Cancer Cells. *Archives of Pharmacal Research*.30(2007):1455–1463
- Rachmawaty *et al.*, 2018. Active Compounds Extraction of Cocoa Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.) and Potential as Fungicides. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1028:012013.
- Rather RA and Bhagat M. 2018. Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front. Cell Dev. Biol.*6(10).doi:10.3389/fcell.2018.00010
- Ravi & Khrisnan. 2017. Cytotoxic potential of N-hexadecanoic acid extracted from *Kigelia pinnata* leaves. *Asian J. Cell Biol.*, 12: 20-27.
- S. Kumari, M.D.R. Elancheran, J. Kotoky, R. Devi, *In vitro* and *in vivo* antioxidant, anti-hyperlipidemic properties and chemical characterization of *Centella asiatica* (L.) extract, *Front. Pharmacol.*7 (2016):400.
- Prayong *et al.* 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*. 79(7-8):598-601
- Quiroz-Reyes C N, Aguilar-Méndez M A, Ramírez-Ortíz M E and Ronquillo-De Jesus E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(1): 11–18.
- Yahya *et al.* 2021. *In-vitro* screenings for biological and antioxidant activities of water extract from theobroma cacao L. Pod husk: Potential utilization in foods. *Molecules*.26(22): 2022
- Zainal *et al.* 2014. Anticancer agent from non-edible parts of *Theobroma cacao*. *Nat Prod Chem Res*.2(4): 2014.