

# ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ BIỂU MÔ GAN VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HOÁ CỦA CAO CHIẾT LÁ CÚC TÀN *PLUCHEA INDICA* (L.) LESS.

## INVESTIGATION INTO THE CYTOTOXICITY AGAINST HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE *PLUCHEA INDICA* (L.) LESS. EXTRACT

Nguyễn Thị Ngọc Quyên<sup>1</sup>, Nguyễn Trung Quân<sup>1</sup>, Hoàng Thành Chí<sup>2</sup>, Bùi Thị Kim Lý<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ / Corresponding author: lybtk@tdmu.edu.vn

(Nhận bài / Received: 08/5/2023; Sửa bài / Revised: 30/6/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 04/7/2023)

**Tóm tắt** – Cây Cúc tần (*Pluchea indica* (L.) Less) là một loài thảo mộc phân bố phổ biến tại khu vực Đông Nam Á. Đây là loài dược liệu được sử dụng nhiều trong y học dân tộc và nổi tiếng với tác dụng điều trị tiêu đường. Mặc dù nhiều nghiên cứu khoa học được tiến hành, song các nghiên cứu về hoạt tính kháng ung thư còn khá hạn chế bao gồm cả ung thư gan. Trong nghiên cứu này, độc tính của cao chiết từ lá cúc tần trên tế bào ung thư biểu mô gan được đánh giá bằng phương pháp MTT. Khả năng kháng oxi hoá của cao chiết được khảo sát bằng thí nghiệm DPPH. Kết quả cho thấy, cao chiết Cúc tần có độc tính cao trên tế bào ung thư biểu mô gan thử nghiệm bao gồm HepG2 (IC<sub>50</sub> = 19,68 ± 2,27 (µg/mL)) và HCC-J5 (IC<sub>50</sub> = 20,37 ± 1,29 (µg/mL)). Cúc tần cũng thể hiện khả năng trung hòa gốc DPPH (EC<sub>50</sub> = 1027 ± 69,65 (µg/mL)).

**Từ khóa** – *Pluchea indica*; ung thư biểu mô gan; HepG2; HCC-J5; DPPH

### 1. Đặt vấn đề

Cây Cúc tần, tên gọi khác là cây từ bi, có tên danh pháp khoa học hai phần là *Pluchea indica* (L.) Less. được mô tả lần đầu năm 1831. Đây là loài cây bản địa thuộc khu vực bán đảo Đông Dương, Đông Bắc Úc và bờ Đông Trung Quốc [1, 2]. Cúc tần được sử dụng khá phổ biến trong y học cổ truyền để điều trị cảm sốt, sỏi mật, lợi tiêu, điều trị đau nhức xương khớp, tăng cường tiêu hóa, tiêu viêm, sát trùng, chữa lành vết thương và các vấn đề sức khỏe khác [3]. Các bằng chứng khoa học cho thấy, loại dược liệu này có tiềm năng phát triển nghiên cứu chuyên sâu hướng tới ứng dụng làm tác nhân điều trị tiêu đường và viêm gan [4-7].

Phân đoạn methanol của chiết xuất rễ cây Cúc tần cho thấy có khả năng bảo vệ gan chống lại tác động gây độc gan gây ra bởi CCl<sub>4</sub> ở chuột cống và chuột nhắt [8]. Dịch chiết này làm giảm đáng kể sự tăng cao nồng độ của các enzyme huyết thanh (aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) và alkaline phosphatase (APL)) và hàm lượng bilirubin huyết thanh trong tổn thương gan cấp tính. Điều này cho thấy hiệu quả của cao chiết Cúc tần trong việc giúp cân bằng trạng thái chức năng bình thường của gan. Trên mô hình gan bị tổn thương cấp tính gây ra bởi CCl<sub>4</sub>, chiết xuất Cúc tần đã cho thấy, có khả năng khôi phục lại hàm

**Abstract** – *Pluchea indica* (L.) Less is a species of herb that grows widely in Southeast Asia. This medicinal species is commonly used in folk medicine and is famous for its anti-diabetic effects. Although many scientific studies are conducted, studies on anticancer activity are relatively limited, including those on liver cancer. In this study, the toxicity of the *P. indica* leaf extract on liver carcinoma cells was determined by MTT assay. The antioxidant capacity of the extract was investigated by a DPPH assay. The results showed that, *P. indica* extract was highly toxic to tested hepatocellular carcinoma cells, including HepG2 (IC<sub>50</sub> = 19.68 ± 2.27 (µg/mL)) and HCC-J5 (IC<sub>50</sub> = 20.37 ± 1.29 (µg/mL)). *P. indica* also exhibits DPPH radical acquisition (EC<sub>50</sub> = 1027 ± 69.65 (µg/mL)).

**Key words** – *Pluchea indica*; hepatocellular carcinoma; HepG2; HCC-J5; DPPH

lượng protein huyết thanh về mức bình thường, cho thấy khả năng cải thiện chuyển hoá protein trong điều kiện độc tính gây ra bởi CCl<sub>4</sub> [8].

Trên lĩnh vực nghiên cứu tế bào học, chiết xuất nước từ Cúc tần có tác dụng chống tăng sinh và chống di căn đây hứa hẹn trên các tế bào thần kinh đệm u ác tính GBM8401 và các tế bào ung thư cổ tử cung HeLa thông qua việc ức chế sự phosphoryl hóa của các protein p53, p21 và AKT, gây ra sự bất giữ chu kỳ tế bào, và gây chết tế bào theo chu trình (apoptosis) [9]. Mặc dù, cúc tần đã được sử dụng trong điều trị bệnh phổ rộng trong y học dân tộc đặc biệt là các bệnh về gan, nhưng các nghiên cứu khoa học liên quan đến khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư gan của cây Cúc tần vẫn chưa có. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu là bước đầu đánh giá độc tính của cao chiết lá cây Cúc tần trên tế bào ung thư biểu mô gan và khả năng kháng oxi hoá của cao chiết.

### 2. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1. Mẫu dược liệu và phương pháp tách chiết

Mẫu lá Cúc tần (*Pluchea indica* (L.) Less.) được thu hái vào tháng 07/2017 tại An Giang. Mẫu dược liệu sau được rửa sạch bằng nước cất hai lần, loại bỏ các lá dập, úng, sâu hại. Sau khi để khô nước, lá Cúc tần được sấy ở 40°C cho

<sup>1</sup> Ho Chi Minh City University of Science - Vietnam National University, Hochiminh, Vietnam (Nguyen Thi Ngọc Quyên, Nguyen Trung Quân)

<sup>2</sup> Thu Dau Mot University, Binhduong, Vietnam (Hoang Thanh Chi, Bui Thi Kim Ly)

đến khi đạt độ ẩm dưới 10%. Mẫu lá khô được xay thành bột mịn. 30 gam bột dược liệu được tách chiết ngâm dầm với methanol tuyệt đối với lượng dung môi ngập 2 – 3 cm (khoảng 300 mL) so với lượng dược liệu, hỗn hợp được lắc liên tục trên máy lắc tốc độ 150 vòng/phút. Sau mỗi 24 giờ, thu lấy dịch chiết và lọc qua giấy lọc. Bổ sung dung môi và chiết tiếp 4 lần với quy trình tương tự. Dịch chiết được thu gom và tiến hành cô quay chân không đến khô hoàn toàn gọi là cao chiết toàn phần. Cao chiết toàn phần được hoà tan trong DMSO (dimethyl sulfoxide) để thu được dung dịch mẹ 200 mg/mL (gọi tắt là PIE), lưu trữ -20°C cho tới khi sử dụng.

## 2.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào ung thư biểu mô gan HepG2 (ATCC) và HCC-J5 được cung cấp bởi TS.BS Huỳnh Thanh Tuấn – Đại học Y Dược Tp. HCM. Tế bào được nuôi cấy bằng môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco) có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum – Sigma-Aldrich) và 5% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) trong tủ nuôi cấy tế bào ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tế bào được tiến hành ly tâm và thay môi trường định kì sau 72 giờ và cấy chuyển khi mật độ tế bào chiếm khoảng 80% diện tích nuôi cấy.

## 2.3. Phương pháp thử nghiệm độc tính

100 µL tế bào được cấy với mật độ đều vào là 2 x 10<sup>5</sup> tế bào/mL trên đĩa 96 giếng. Sau 24 giờ, 100 µL PIE ở các nồng độ khác nhau được bổ sung vào giếng thí nghiệm. Sau 72 giờ nuôi cấy, phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid - Sigma-Aldrich) được thực hiện để xác định tỷ lệ tế bào sống [10]. Cụ thể: Môi trường nuôi cấy được loại bỏ khỏi các giếng thử nghiệm, sau đó đồng bổ sung 200 µL môi trường DMEM không chứa FBS và 20 µL dung dịch MTT, ủ đĩa thử nghiệm trong 2,5 giờ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, dung dịch môi trường chứa MTT được loại bỏ sau quá trình ủ, kết tủa được hoà tan trong 100 µL DMSO (Sigma-Aldrich) và đọc kết quả ở 570/630 nm. Nghiệm thức với DMSO được dùng làm đối chứng âm cho thí nghiệm.

## 2.4. Phương pháp quan sát hình thái tế bào

Kính hiển vi soi ngược tại độ phóng đại 100 lần được sử dụng cho quá trình theo dõi hình thái tế bào. Tế bào được nuôi cấy trên đĩa 6 giếng với mật độ đều vào là 2 x 10<sup>5</sup> tế bào/mL sau 24 giờ. Sau 72 giờ nuôi cấy, hình thái tế bào được ghi nhận.

## 2.5. Phương pháp thử nghiệm DPPH

Khả năng kháng oxi hoá của cao chiết được khảo sát bằng thí nghiệm thu giữ gốc tự do DPPH [11]. Dịch chiết các nồng độ được phản ứng với dung dịch 0,3 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - Sigma-Aldrich) theo tỷ lệ thể tích 1: 1 trong 30 phút ở 37°C. Hỗn hợp sau phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở 517 nm. Phần trăm gốc tự do DPPH được trung hòa được tính theo công thức:

$$\%DPPH_{\text{được trung hòa}} = (OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{chứng âm}}) / OD_{\text{chứng âm}} \times 100$$

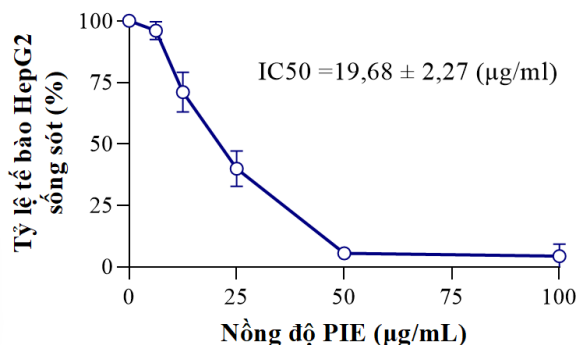
## 2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại tối thiểu ba lần. Số liệu được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các phân tích thống kê được tiến hành bằng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 9.0.0 với mức ý nghĩa  $\alpha$  là 0,05.

## 3. Kết quả và thảo luận

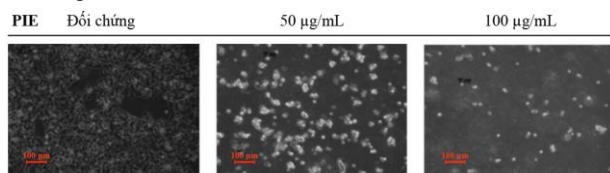
### 3.1. PIE gây ức chế tăng sinh trên tế bào HepG2

Kết quả thu nhận được 0,88 g cao chiết PIE tương đương hiệu suất thu nhận cao chiết là 2,93%. Kết quả thử nghiệm độc tính của cao chiết trên tế bào HepG2 cho thấy, tác động ức chế tăng sinh tế bào phụ thuộc vào nồng độ cao chiết. Bắt đầu từ mức nồng độ 6,25 µg/mL PIE trong môi trường, tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót nhanh chóng giảm sút và duy trì dưới 5% tế bào sống sót khi nồng độ PIE lớn hơn 50 µg/mL (Hình 1). Kết quả hồi quy phi tuyến tính theo mô hình  $Y=100/(1+10^{(X-\text{LogIC}_{50})})$  ghi nhận được kết quả IC<sub>50</sub> = 19,68 ± 2,27 (µg/mL) cho tác dụng của PIE lên tế bào HepG2 với hệ số tương quan đường hồi quy R<sup>2</sup> = 0,9827.



Hình 1. Biểu đồ biểu hiện tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót giảm mạnh dưới tác dụng của cao chiết PIE

Nghiên cứu trước đây cho thấy, ở nồng độ 0,1% DMSO, sức sống tế bào HepG2 không bị ảnh hưởng [12]. Do đó, các tác động ức chế tăng sinh ghi nhận trong thí nghiệm ở Hình 1 là do tác động của cao chiết PIE. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy cao chiết *P. indica* có khả năng ức chế tăng sinh và di chuyển của tế bào ung thư trên mô hình tế bào ung thư cổ tử cung (Hela) và ung thư mô đệm thần kinh (GBM8401) [13]. Vì giá trị IC<sub>50</sub> của cao chiết dược liệu thô nhỏ hơn 30 µg/mL nên dịch chiết PIE được xem xét là có hoạt tính ức chế tế bào HepG2 mạnh và có tiềm năng phát triển nghiên cứu ứng dụng trong tương lai [14, 15]. Các tác động trong điều trị bệnh lý tiêu đường, viêm gan của *P. indica* cũng đã được báo cáo qua nhiều công bố, tuy nhiên các nghiên cứu ức chế tế bào ung thư gan vẫn còn hạn chế [4-7]. Tác động ức chế tế bào HepG2 cũng đã được xác định trên đối tượng cùng chi khác là *P. lanceolata* (DC.) Oliv. với hiệu quả tác động của cao chiết nước (IC<sub>50</sub> = 0,004 ± 0,0039 mg/mL), cao chiết methanol (IC<sub>50</sub> = 0,08 ± 0,03 mg/mL), và cao chiết ethanol (0,40 ± 0,34 mg/mL) [16].



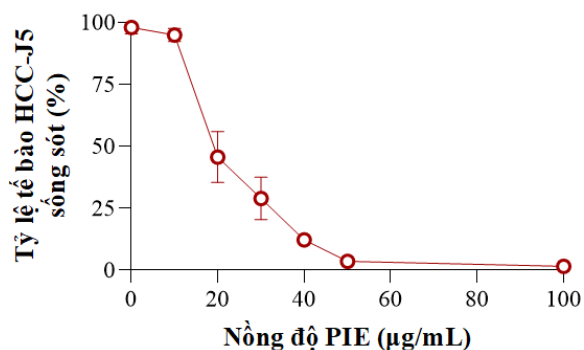
Hình 2. Hình ảnh tế bào HepG2 sau 72 giờ tiếp xúc cao chiết

Song song với quá trình ghi nhận tỷ lệ sống tế bào, hình thái tế bào dưới tác động cao chiết cũng được ghi nhận và phản ánh kết quả tương tự (Hình 2). So với nghiệm thức đối chứng, tế bào ở nghiệm thức 50 µg/mL PIE có xu

hướng co cụm, bóc tách khỏi bề mặt nuôi cấy, trong khi hầu hết các tế bào đều bị bóc tách hoàn toàn ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  PIE.

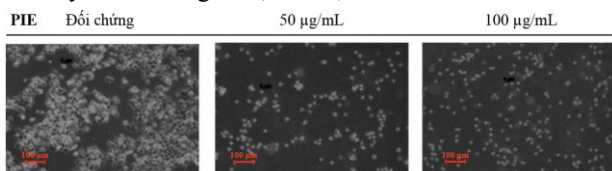
### 3.2. PIE gây ức chế tăng sinh trên tế bào HCC-J5

Kết quả tác động tương tự của cao chiết PIE cũng được ghi nhận trên dòng tế bào ung thư biểu mô gan HCC-J5 [17]. Tỷ lệ tế bào sống sót nhanh chóng giảm mạnh khi nồng độ PIE trong môi trường vượt ngưỡng 10  $\mu\text{g/mL}$  (Hình 3). Hầu như không còn ghi nhận tín hiệu sống sót của tế bào khi nồng độ cao chiết lớn hơn 50  $\mu\text{g/mL}$ . Giá trị IC<sub>50</sub> sau hồi quy phi tuyến tính là  $20,37 \pm 1,29$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) với hệ số tương quan  $R^2 = 0,9721$ .



Hình 3. Biểu đồ biểu hiện tỷ lệ tế bào HCC-J5 sống sót giảm mạnh dưới tác dụng của cao chiết PIE

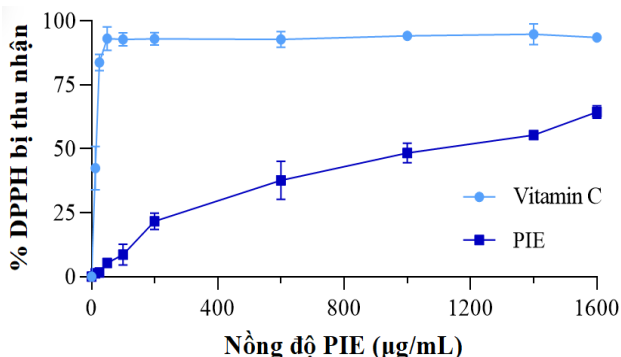
Cũng như tác động trên HepG2, tác động của PIE trên HCC-J5 cũng được phân loại là có tác động mạnh [14, 15]. Quan sát hình thái nhận thấy, ở nồng độ 50 và 100  $\mu\text{g/mL}$ , hầu hết tế bào đều bị bóc tách hoàn toàn, không còn quan sát thấy tế bào sống sót (Hình 4).



Hình 4. Hình ảnh tế bào HCC-J5 sau 72 giờ tiếp xúc cao chiết

### 3.3. Khả năng kháng oxy hoá của cao chiết PIE

Thí nghiệm DPPH được tiến hành để khảo sát khả năng trung hoà gốc tự do của cao chiết PIE trong điều kiện *in vitro*. Độ hấp thụ quang phổ của DPPH giảm dần theo chiều tăng dần nồng độ của cao chiết PIE (Hình 5). Vitamin C được sử dụng làm đối chứng dương của thí nghiệm.

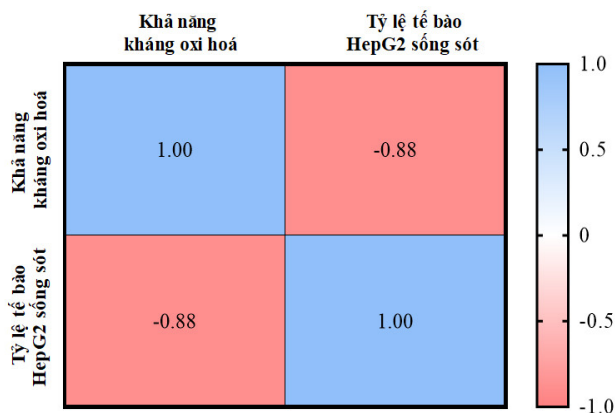


Hình 5. Tác động trung hòa DPPH của cao chiết PIE

Kết quả cho thấy, vitamin C nhanh chóng đạt trạng thái bão hoà thu nhận gốc tự do DPPH ở nồng độ 25  $\mu\text{g/mL}$ , kết quả này cũng được ghi nhận ở các báo cáo trước đó [11, 18, 19]. Giá trị EC<sub>50</sub> được xác định bằng phương pháp hồi quy phi tuyến tính theo mô hình  $Y=100*(X^{\text{Hillslope}})/(EC50^{\text{Hillslope}} + (X^{\text{Hillslope}}))$ . Kết quả ghi nhận giá trị EC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) lần lượt của vitamin C và PIE là  $13,93 \pm 1,47$  và  $1027 \pm 69,65$   $\mu\text{g/mL}$ . Các hợp chất phenol, flavonoid, tannin và alkaloid là các thành phần hợp chất thứ cấp chính có trong *P. indica*, trong đó thành phần phenol được xác định là  $68,37 \pm 10,61$  mg/g tính theo tham chiếu axit gallic, thành phần flavonoid được xác định là  $11,71 \pm 0,03$  mg/g theo tham chiếu EGCG [20]. Kết quả khả năng kháng oxy hoá thông qua thí nghiệm bắt giữ DPPH của cao chiết PIE trong bài nghiên cứu này thấp hơn so với dịch chiết nước của *P. indica* trong báo cáo trước đây [21]. Thành phần và hàm lượng của các hợp chất thứ cấp ảnh hưởng lớn đến việc hình thành hoạt tính sinh học của cao chiết thực vật, các thành phần này được ghi nhận là thay đổi theo điều kiện thổ nhưỡng hay thời điểm thu hái [22].

### 3.4. Mối liên hệ giữa hoạt tính kháng oxy hoá và ức chế tăng sinh tế bào ung thư biểu mô gan của cao chiết PIE

Một ma trận tương quan đã được thiết lập dựa trên kết quả %DPPH bị bắt giữ và tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót tại các điểm nồng độ 6,25; 12,5; 25; 50 và 100  $\mu\text{g/mL}$  của PIE.



Hình 6. Sự liên hệ giữa hoạt động kháng oxy hoá thông qua thí nghiệm DPPH và tác động gây độc tế bào ung thư biểu mô gan (HepG2) của cao chiết PIE

Tác dụng trung hoà thể oxy hoá khử đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ các tế bào khỏi các tác động xấu như đứt gãy DNA, tích lũy đột biến và có thể gây khởi phát ung thư [23]. Bên cạnh đó, mối liên hệ giữa hoạt tính kháng oxy hoá và ức chế tế bào ung thư đã được báo cáo trong nhiều công trình nghiên cứu trước đây [24-26]. Kết quả phân tích hệ số tương quan r (Pearson r) của ma trận được xác định là -0,88 (Hình 6). Hệ số tương quan r lớn hơn -0,8, mối tương quan giữa khả năng bắt giữ DPPH và sức sống của tế bào HepG2 của PIE được đánh giá là có quan hệ mạnh theo xu hướng ngược [27]. Hoạt tính kháng oxy hoá càng mạnh, tác dụng gây độc tế bào ung thư biểu mô gan càng cao.

#### 4. Kết luận

Các kết quả thử nghiệm cho thấy, cao chiết methanol từ lá Cúc tần cho hiệu quả ức chế tăng sinh tế bào ung thư biểu mô gan mạnh và biểu hiện khả năng thu nhặt gốc oxy hoá tự do DPPH. Hai hoạt tính sinh học khảo sát được ghi nhận là có mối liên hệ mật thiết với nhau theo chiều hướng tương hỗ nhau, song vẫn cần các nghiên cứu chuyên sâu chứng minh mối liên hệ này một cách cụ thể.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Bremer, *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Timber press, 1994, pp. 752.
- [2] C.-I. Peng, C.-H. Chen, W.-P. Leu, and H.-F. Yen, "Pluchea Cass. (Asteraceae) in Taiwan", *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. vol. 39, pp. 287-297, 1998.
- [3] W. Buranasukhon, S. Athikomkulchai, S. Tadtong, and C. Chittasupho, "Wound healing activity of Pluchea indica leaf extract in oral mucosal cell line and oral spray formulation containing nanoparticles of the extract", *Pharm Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 1767-1774, 2017.
- [4] J. Nopparat, A. Nualla-ong, and A. Phongdara, "Ethanol extracts of Pluchea indica (L.) leaf pretreatment attenuates cytokine-induced  $\beta$ -cell apoptosis in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic mice", *Plos One.*, vol. 14, no. 2, pp. e0212133, 2019.
- [5] W. Suriyah, S. Ichwan, A. R. Kasmuri, and M. Taher, "In vitro Evaluation of the Effect of Pluchea indica Extracts in Promoting Glucose Consumption Activity on A Liver Cell Line", *Makara Journal of Health Research*. vol. 23, no. 1, pp. 48-52, 2019.
- [6] K. Sirichaiwetchakoon, S. Churproong, S. Kupittayanant, and G. Eumkeb, "The Effect of Pluchea indica (L.) Less. Tea on Blood Glucose and Lipid Profile in People with Prediabetes: A Randomized Clinical Trial", *J. Altern Complement Med.*, vol. 27, no. 8, pp. 669-677, 2021.
- [7] J. Nopparat, A. Nualla-Ong, and A. Phongdara, "Treatment with Pluchea indica (L.) Less. leaf ethanol extract alleviates liver injury in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic BALB/c mice", *Experimental and Therapeutic Medicine*. vol. 20, pp. 1385-1396, 2020.
- [8] T. Sen, A. Basu, R. Ray, and A. N. Chaudhuri, "Hepatoprotective effects of Pluchea indica (less) extract in experimental acute liver damage in rodents", *Phytotherapy Research*. vol. 7, no. 5, pp. 352-355, 1993.
- [9] J. J. Cho *et al.*, "Crude aqueous extracts of Pluchea indica (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death", *BMC Complement Altern Med*. vol. 12, pp. 265, 2012.
- [10] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*. vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [11] B. Ly, Q. Nguyen, L. Dao, H. Nguyen, M. Lam, and C. Hoang, "Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Dialium cochinchinensis Seed Extract", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 81, no. 5, pp. 975-980, 2019.
- [12] M. Nakanishi, Y. Tomaru, H. Miura, Y. Hayashizaki, and M. Suzuki, "Identification of transcriptional regulatory cascades in retinoic acid-induced growth arrest of HepG2 cells", *Nucleic acids research*. vol. 36, pp. 3443-54, 2008.
- [13] J. Cho *et al.*, "Crude aqueous extracts of Pluchea indica (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death", *BMC complementary and alternative medicine*. vol. 12, 2012, pp. 265.
- [14] S. Vijayarathna and S. Sasidharan, "Cytotoxicity of methanol extracts of Elaeis guineensis on MCF-7 and Vero cell lines", *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. vol. 2, no. 10, pp. 826-829, 2012.
- [15] G. Indrayanto, G. S. Putra, and F. Suhud, "Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research", *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. vol. 46, pp. 273-307, 2021.
- [16] R. Humbare, J. Sarkar, A. Kulkarni, and S. Kamble, "Evaluation of Free Radical Scavenging with in vitro Antiproliferative Properties of Different Extracts of Pluchea lanceolata (DC.) Oliv. and Hiern in Cancer Cell Lines", *Pharmacognosy Magazine*. vol. 17, pp. 886-892, 2022.
- [17] M. R. Chen, T. Y. Hsu, M. J. Chou, A. C. Chang, J. Y. Chen, and C. S. Yang, "Stability of HBV DNA in cell lines and nude mouse-passaged tissues derived from human hepatocellular carcinoma", *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. vol. 27, no. 1, pp. 1-12, 1994.
- [18] S. Boussaha *et al.*, "Chemical Constituents, in vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Perralderia coronopifolia Coss. subsp. eu-coronopifolia M. var. typica M. extract", *Records of Natural Products*. vol. 9, pp. 312-322, 2015.
- [19] H. Boufeldja and K. Hadeif, "Mycoschemical contents, Free-radical scavenging capacity and anti-microbial activity of wild edible mushroom from Algeria", *South Asian Journal of Experimental Biology*. vol. 11, pp. 605-618, 2021.
- [20] R. Chiangnoon *et al.*, "Phytochemical Analysis, Antioxidant, and Wound Healing Activity of Pluchea indica L. (Less) Branch Extract Nanoparticles", *Molecules*, vol. 27, pp. 1-21, 2022.
- [21] K. Srisook, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Pluchea indica Less herbal tea", *Journal of medicinal plant research*. vol. 6, pp. 4077, 2012.
- [22] B. Vongsak, S. Kongkiatpaiboon, S. Jaisamut, and K. Konsap, "Comparison of active constituents, antioxidant capacity, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition in Pluchea indica leaf extracts at different maturity stages", *Food Bioscience*. vol. 25, pp. 68-73, 2018.
- [23] M. K. Shigenaga and B. N. Ames, "Oxidants and mitogenesis as causes of mutation and cancer: the influence of diet", *Basic Life Sci*. vol. 61, pp. 419-36, 1993.
- [24] M. Greenwell and P. K. Rahman, "Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment", *Int J Pharm Sci Res*. vol. 6, no. 10, pp. 4103-4112, 2015.
- [25] A. K. Alam *et al.*, "The Antioxidative Fraction of White Mulberry Induces Apoptosis through Regulation of p53 and NF $\kappa$ B in EAC Cells", *PLoS One*. vol. 11, no. 12, pp. e0167536, 2016.
- [26] S. Islam *et al.*, "Evaluation of antioxidant and anticancer properties of the seed extracts of Syzygium fruticosum Roxb. growing in Rajshahi, Bangladesh", *BMC Complement Altern Med*. vol. 13, pp. 142, 2013.
- [27] D. Ratnasari, F. Nazir, L. O. H. Z. Toresano, S. Pawiro, and D. Soejoko, "The correlation between effective renal plasma flow (ERPF) and glomerular filtration rate (GFR) with renal scintigraphy 99m Tc-DTPA study", *Journal of Physics: Conference Series*. vol. 694, pp. 012062, 2016.