

## Konsentrasi Aman Kurkumin dan PGV-0 terhadap Sel Vero Berdasarkan Hasil Uji Sitotoksik

### Safety Concentration of Curcumin and PGV-0 to Vero Cells Base on Cytotoxic Test Results

Dewi Marbawati<sup>1\*</sup>, Sarjiman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang, Banjarnegara, Jawa Tengah

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta

\*E-mail : dewimarba@yahoo.co.id

Diterima: 1 April 2015

Direvisi: 21 Mei 2015

Disetujui: 28 Agustus 2015

#### Abstrak

Kurkumin (1,7-bis(4'hidroksi-3 metoksifenil)-1,6 heptadien, 3,5-dion) merupakan pigmen kuning dari *Curcuma longa*. Kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologi di antaranya sebagai antioksidan, antibakteri, antijamur, antiprotozoa dan antivirus. Berbagai kemanfaatan kurkumin tidak lepas dari kelemahan kurkumin yaitu tidak stabil terhadap pH dan cahaya. Pentagamavunon-0 (PGV-0) dibuat dengan mengubah gugus  $\beta$  di keton pada kurkumin menjadi analog gugus monoketon sekaligus menghilangkan gugus metilen aktif sehingga bersifat lebih stabil terhadap pH dan cahaya. Pentagamavunon-0 juga memiliki potensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi lebih kuat dibanding senyawa analog kurkumin lainnya. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero, dikarenakan semakin banyaknya penggunaan kedua senyawa tersebut melalui uji sitotoksik. Penelitian ini termasuk penelitian esperimental. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode *microculture tetrazolium technique* (MTT). Penggunaan MTT untuk mengevaluasi efek sitotoksik suatu senyawa didasarkan pada perubahan garam tetrazolium menjadi kristal formazan oleh enzim mitokondria suksinat dehidrogenase dengan bantuan NADH seluler. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero adalah 6,25 dan 1,5625 ppm. Berdasarkan hasil uji sitotoksik terhadap sel vero ternyata konsentrasi aman kurkumin lebih tinggi daripada PGV-0.

**Kata Kunci:** Kurkumin; Pentagamavunon-0; Uji sitotoksik; Sel vero

#### Abstract

*Curcumin (1,7-bis(3-methoxyphenyl 4'hydroxy) -1.6 heptadien, 3,5-dione) is the yellow pigment of Curcuma longa. Curcumin has various biological activities such as antioxidant, antibacterial, antifungal, antiprotozoal and antivirus. Various benefits of curcumin can not be separated from the weakness which is not stable to pH and light. Pentagamavunon-0 (PGV-0) were made by changing the  $\beta$  diketone group on cluster analog of curcumin into monoketon while eliminating active methylene group so it is more stable to pH and light. PGV-0 also has potential as a stronger antioxidant and antiinflammatory agent than other curcumin analogues. The objective of this research was to determine the safe concentrations of curcumin and PGV-0 on vero cells due to the increased use of the two compounds through the cytotoxic test. This research includes experimental research. Cytotoxic test performed with microculture tetrazolium technique (MTT) method. Use of MTT to evaluate the cytotoxic is based on changes of tetrazolium salt into formazan crystals by mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase with the help of cellular NADH. The results showed that the safe concentrations of curcumin and PGV-0 on vero cells respectively are 6.25 and 1.5625 ppm. Based on the cytotoxic test the secure concentration of curcumin was higher than PGV-0.*

**Key words:** Curcumin; Pentagamavunon-0; Cytotoxic test; Vero cell

## PENDAHULUAN

Kurkumin telah lama digunakan dalam pengobatan dunia timur dan banyak mendapatkan perhatian di negara barat. Lebih dari satu miliar orang mengonsumsi kurkumin secara teratur dalam diet mereka. Kurkumin juga telah menjadi bahan dari ratusan penelitian yang dilakukan dalam tiga dekade terakhir. Lebih dari 65 uji klinis kurkumin telah selesai dan kurkumin terbukti aman dikonsumsi.<sup>1</sup> Kurkumin (1,7-bis(4'-hidroksi-3-metoksi-fenil)-1,6 heptadien, 3,5-dion)<sup>2</sup> merupakan pigmen kuning dari *Curcuma longa* dengan polifenol rendah dan berat molekul 368,37. Penelitian tentang kurkumin banyak terkait dengan pemanfaatan kurkumin sebagai antioksidan, antiinflamasi, kemopreventif dan kemoterapi.<sup>3,4</sup> Kurkumin juga memiliki aktivitas sebagai antifertilitas, antidiabetes, antibakteri, antijamur, antiprotzoa, anti virus.<sup>5,6,7</sup> Kurkumin juga dilaporkan aman dikonsumsi sampai dengan 8 gr/hari.<sup>8</sup>

Berbagai kemanfaatan kurkumin tidak lepas dari kelemahan kurkumin yaitu tidak stabil terhadap pH dan cahaya.<sup>8,9</sup> Pada pH netral kurkumin akan terdegradasi menjadi trans -6-(4-o-hidroksi-3-o-metoksi-fenil)-2,4-diookso-5-heksanal, asam ferulat, *ferul oylmethane* and vanilin.<sup>10,11</sup> Instabilitas kurkumin juga dipengaruhi oleh adanya cahaya yang menyebabkan terjadinya degradasi fotokimia. Ketidakstabilan senyawa ini mendorong penelitian membuat senyawa mirip kurkumin yang diharapkan lebih stabil terhadap pH dan cahaya namun memiliki efek sama atau bahkan lebih baik dari kurkumin. Dengan pertimbangan tersebut dibuat senyawa analog kurkumin yaitu Pentagamavunon-0 [2,5-bis(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin) siklopentanon] yang dikenal dengan PGV-0.

PGV-0 memiliki berat molekul 352,130 dibuat dengan merubah gugus  $\beta$  diketon pada kurkumin menjadi analog gugus monoketon sekaligus menghilangkan gugus metilen aktif sehingga bersifat

lebih stabil terhadap pH dan cahaya.<sup>12,13</sup> Senyawa ini diharapkan masih tetap memberikan aktivitas dengan spektrum yang sama dengan aktivitas kurkumin, tetapi dengan kualitas yang lebih baik, yaitu berefek lebih besar dan aman. PGV-0 juga relatif lebih mudah dalam sintesisnya, memiliki potensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi lebih kuat dibanding senyawa analog kurkumin lainnya, misalnya heksagamavunon-0 (HGV-0) dan gamavuton-0 (GVT-0).<sup>14</sup> PGV-0 mempunyai aktivitas biologis mirip kurkumin yaitu aktivitas antifungi, antibakteri, antiinflamasi, antioksidan dan penghambatan siklooksigenase. Senyawa ini aktivitas sebagai antioksidan dikarenakan adanya gugus OH fenolik pada strukturnya.<sup>14,15</sup> Mekanisme antiinflamasi melalui penghambatan siklooksigenase pada tikus jantan Wistar dan sitotoksik pada sel mieloma.<sup>14,16</sup>

Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel vero yaitu sel monolayer dan termasuk jenis *epithelial-like*, yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Sel vero banyak digunakan dalam penelitian biologi molekuler, mikrobiologi dan bahan pembuatan vaksin.<sup>17</sup> Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan di laboratorium parasitologi fakultas kedokteran UGM.

### Persiapan bahan dan media.

Kurkumin yang digunakan dibeli dari Sigma, sedangkan senyawa analog kurkumin (PGV-0) diperoleh dari hasil sintesis di Laboratorium Farmasi UGM. Pembuatan larutan stok diperoleh dengan cara masing – masing senyawa (kurkumin dan PGV-0) ditimbang 5 mg kemudian dilarutkan dalam Dimetilsulfoksida (Merck) 100  $\mu$ L dan disimpan sebagai

larutan stok untuk selanjutnya digunakan dalam penelitian.

Pembuatan media M-199 untuk menumbuhkan sel vero, dilakukan dengan cara serbuk media M-199 untuk 1 L dilarutkan dengan akuades kurang lebih 800 ml dalam gelas piala 1 L, selanjutnya ditambah 2,2 g sodium bikarbonat dan 2 g (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Semua bahan tersebut diaduk dengan stirer sampai semua bahan larut. Larutan diatur pHnya sampai 7,2 dengan menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Larutan dibuat menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter 0,2 µm ke dalam botol tertutup yang steril. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C dan diberi label. Untuk membuat media tumbuhnya dengan cara media M199 ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 %, *Penicillin Streptomycin* (Penstrep) 2% dan fungizon 0,5 % hingga volume 100 mL, sedangkan untuk media *maintenance* berbeda dalam jumlah FBS yaitu 3 % saja.

Sel vero ditumbuhkan dengan cara satu vial sel vero dari tabung nitrogen cair diambil dan dibiarkan mencair di dalam *laminary flow hood*. Setelah mencair sel dipindah ke dalam tabung sentrifus 15 ml, ditambahkan *Phospat Buffer Saline* (PBS) steril dan media stok M-199 sampai 10 ml kemudian disentrifus pada 600 g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet (sel vero) dimasukkan ke dalam botol kultur yang telah diisi dengan medium penumbuh. Sel disuspensi dengan pipet agar sel tidak menggerombol, kemudian siap untuk ditumbuhkan dalam botol flask. Sel diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> suhu 37°C. Setiap hari pertumbuhan sel diamati pada *inverted microscope*.

#### **Pemanenan, penghitungan dan uji sitotoksik sel vero.**

Sel diamati dibawah *inverted microscope*. Apabila pertumbuhan sel telah konfluen, media menjadi kuning, sel siap dipanen. Pemanenan dilakukan dengan cara sebagai berikut: media kultur

dibuang, diganti dengan tripsin secukupnya (merata pada seluruh permukaan flask). Penyemprotan dengan PBS steril dilakukan sampai sel terlepas seluruhnya. Sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse ditambahkan media stok M-199 secukupnya kemudian disentrifus selama 10 menit pada 600 g. Penghitungan sel dilakukan sebagai berikut: supernatan dibuang, pelet disuspensi dengan 1 ml media penumbuh. Suspensi sel diambil sebanyak 10 µl ditetaskan pada bilik hitung hemositometer dan dihitung pada keempat biliknya. Jumlah sel dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{A}{4} \times F \times 10^4$$

A = Jumlah sel pada empat sisi bilik hemositometer  
F = Faktor pengenceran.

Uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero dilakukan dengan menggunakan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida]. Sel dengan kepadatan 10<sup>4</sup> sel/sumuran untuk sel vero didistribusikan ke dalam 96 *well plate*, pengulangan dilakukan sebanyak 4 (empat) kali (4 sumuran) dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, ditambahkan senyawa uji kurkumin dan PGV-0 dengan 7 (tujuh) seri konsentrasi yaitu 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 dan 0,78125 ppm. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan senyawa uji ini adalah DMSO. Dalam perlakuan dibuat juga kontrol DMSO dengan seri konsentrasi yang sama dengan senyawa uji. Pada akhir inkubasi, campuran media dan senyawa uji dalam *plate* dibuang dan digantikan dengan 100 µL media kultur (M-199) yang mengandung MTT 5 mg/ml, dan diinkubasi lagi selama 4 jam pada 37°C inkubator CO<sub>2</sub> 5 %. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambahkan reagen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 µL, kemudian *plate* dibungkus dengan

aluminium foil inkubasikan dalam tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Keesokan harinya dibaca serapannya dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dari uji MTT, dikonversikan dalam bentuk persentase sel hidup atau viabilitas sel yang dapat dihitung dengan rumus berikut.

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel perlakuan} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

Analisis data dilakukan secara deskriptif dalam bentuk grafik persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0 dan gambar sel vero yang diberi perlakuan kurkumin dan PGV-0.

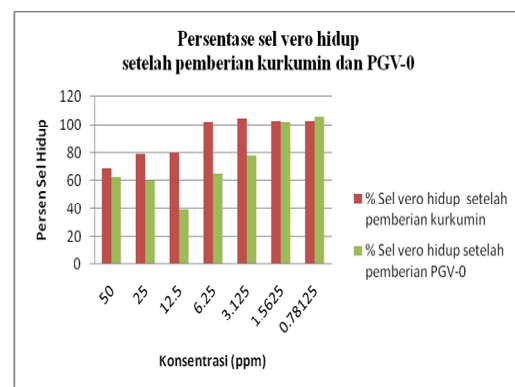
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik yang dapat mendasari pemanfaatan senyawa tersebut. Sel vero yang digunakan dalam penelitian ini harus berada pada kondisi konfluen. Bentuk sel vero yang normal tampak seperti daun kecil-kecil dan menempel pada dasar flask. Sel yang mati tidak menempel pada dasar flask, tampak terapung dan bentuknya bulat. Tripsinasi dilakukan untuk melepas sel dari sumuran dan selanjutnya jumlah sel dihitung dengan hemositometer. Jumlah sel yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah 10.000 sel per sumuran.

Uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 menggunakan tujuh peringkat konsentrasi yaitu 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 dan 0,78125 ppm. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan senyawa uji ini adalah DMSO, karena kelarutan dalam air kedua senyawa tersebut sangat kecil. Pengamatan kesitotoksikan suatu senyawa terhadap sel yang hidup dilakukan dengan metode MTT yaitu dengan melihat perubahan garam tetrazolium menjadi produk berwarna biru (kristal formazan) oleh

enzim mitokondria suksinat dehidrogenase dengan bantuan NADH seluler. Kelebihan metode MTT yaitu relatif cepat, sensitif, akurat dan banyak sampel dapat diuji. Pengukuran ini didasarkan pada kapasitas enzim mitokondria suksinat dehidrogenase dari sel hidup untuk merubah MTT menjadi produk formazan. Jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup dari berbagai variasi tipe sel.<sup>18</sup>

Persentase sel vero yang hidup dihitung berdasarkan perbandingan antara absorbansi perlakuan senyawa uji dengan kontrol sel vero. Persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0 dapat dilihat seperti grafik berikut.



**Gambar 1. Persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0**

Gambar 1 menunjukkan hasil uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero. Penurunan konsentrasi senyawa uji berkorelasi positif dengan persentase jumlah sel yang hidup pada perlakuan dengan kurkumin. Pada perlakuan dengan PGV-0 sebagian tidak berkorelasi positif. Hasil penghambatan oleh PGV-0 menunjukkan semakin rendah konsentrasi senyawa, jumlah sel hidup pada tiga konsentrasi pertama menurun dan selanjutnya meningkat, penurunan jumlah sel hidup dapat terjadi karena beberapa hal, diantaranya senyawa yang tidak larut sempurna atau terjadi kesalahan dalam pipetasi.<sup>19</sup> Hasil uji sitotoksik untuk senyawa kurkumin adalah 6,25 ppm

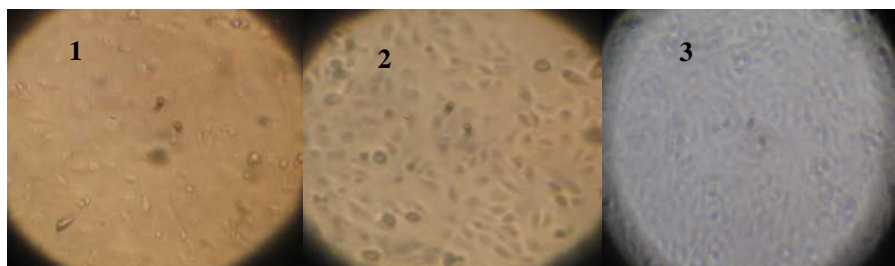
sedangkan untuk PGV-0 adalah 1,56 ppm. Kedua konsentrasi tersebut didapatkan dari hasil perhitungan persen sel hidup yang lebih dari 100 %.

Dalam penelitian ini, pelarut yang digunakan untuk senyawa uji yaitu DMSO dengan konsentrasi tertinggi (50 ppm). Hasil pengamatan mikroskopis dan perhitungan sel hidup ternyata tidak berpengaruh terhadap kematian sel vero. Menurut Nogaki et al., penggunaan DMSO sebagai pelarut dalam uji sitotoksitas terhadap sel HSC-4 tidak mempengaruhi pertumbuhan sel tersebut.<sup>20</sup> Hal ini memungkinkan penggunaan DMSO sebagai pelarut senyawa uji tanpa memengaruhi pertumbuhan dan kematian sel vero. Zandia et al., menyatakan konsentrasi DMSO sebagai pelarut yang kurang dari 2% dapat diabaikan.<sup>21</sup>

Gambar 2 menunjukkan morfologi sel vero setelah pemberian kurkumin konsentrasi 6,25 ppm, sel-sel tersebut tampak utuh dengan ukuran relatif sama, walaupun ada beberapa yang bentuknya menjadi bulat dan mengambang. Pada gambaran morfologi sel vero setelah pemberian PGV-0 dengan konsentrasi 6,25 ppm, tampak hampir separuh sel vero mengalami kematian yang ditunjukkan dengan banyaknya sel yang mengambang.

Gambaran sel vero yang diberi perlakuan DMSO dengan konsentrasi tertinggi yaitu 50 ppm tidak menunjukkan perubahan jumlah dan bentuk sel vero yang berarti aman untuk sel vero.

Potensi kesitotoksikan PGV-0 lebih tinggi dibanding kurkumin, karena nilai konsentrasi yang aman terhadap sel vero untuk PGV-0 bernilai lebih kecil dari kurkumin. Peningkatan potensi kesitotoksikan PGV-0 tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya perubahan gugus  $\beta$ -diketon pada kurkumin menjadi gugus siklopentanon sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel vero. Pada kultur sel vero yang diberi perlakuan dengan senyawa kurkumin dan PGV-0 dengan konsentrasi bertingkat, tampak adanya perubahan gambaran morfologi sel vero. Mekanisme kematian sel vero pada tingkat molekuler akibat pemberian kurkumin maupun senyawa turunannya belum dapat diketahui berdasarkan uji sitotoksitas ini. Kematian sel tersebut kemungkinan dapat melalui mekanisme pemacuan terjadi apoptosis. Penelitian lebih mendalam yang berkaitan dengan proses apoptosis dapat dilakukan untuk mengetahui hal ini.



**Gambar 2. Sel vero yang diberi perlakuan kurkumin, PGV-0 dan DMSO**

Keterangan:

1. Sel vero yang diberi perlakuan kurkumin konsentrasi 6,25 ppm.
2. Sel vero yang diberi perlakuan PGV-0 konsentrasi 6,25 ppm.
3. Sel vero yang diberi perlakuan DMSO konsentrasi 50 ppm.

(Foto perbesaran 400 x).

## KESIMPULAN

Konsentrasi aman kurkumin dan PGV-0 dari hasil uji toksisitas sel vero yaitu 6,25 ppm dan 1,5625 ppm

## SARAN

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme sitotoksik dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J*. 2013;15(1):195–218.
2. Singh RK, Rai D, Yadav D, Bhargav A, Balzarini J, De Clercq E, et al. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 45: 1078–86.
3. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(11):1631-52.
4. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U and Banerjee RK, Turmeric and Curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. *Current Science*. 2004; 87(1):44-53.
5. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:1-75.
6. Buadonpri W, Wichitnithad W, Rojsitthisak P, Towiwat P. Synthetic curcumin inhibits carragennan-induced paw edema in rats. *J Health Res*. 2009; 23(1):11- 6.
7. Singh RK, Rai D, Yadav D, Bhargava A, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;45:1078–86
8. Gangait A, Barman T, Mukherjee PK. Validated method for the estimation of curcumin in turmeric powder. *Indian journal of traditional knowledge*. 2011;10(2):247-50.
9. Tonnesen HH. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Studies of curcumin and curcuminoids*, XXVIII, *Pharmazie*. 2002;57(12):820-4.
10. Liang G, Shao L, Wang Y, Zhao C, Chu Y, Xiao J. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 2009;17(6):2623-31.
11. Kumavat SD, Chaudhari YS, Borole P, Mishra P, Shenghani K, Duvvuri P. Degradation Studies Of Curcumin. *International Journal of Pharmacy Review & Research*. 2013;3(2),50-5.
12. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur. J. of Cancer*. 2005;41:1955- 68.
13. Van der Goot H. The chemistry and qualitative structure-activity relationship of curcumin, in *Recent Development in Curcumin Pharmacology*, Proceedings of The International Symposium on curcumin Pharmacology (ISCP), August 29 – 31. 1995. Edited by Suwijyo Pramono, Aditya Media, Yogyakarta. Indonesia.1997
14. Sardjiman. Synthesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Anti-oxidative, anti-inflammatory, antibacterial activities and qualitative-structure Activity Relationship. Dissertation. Gadjah Mada University. Yogyakarta; 2000.
15. Yuniarti N, Nugroho PA, Asyhar A, Sardjiman S, Ikawati Z, Istyastono EP. In vitro and in silico studies on curcumin and its analogues as dual inhibitors for cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). *Journal of Mathematic and Fundamental Science*. 2012;44(1):51-66.
16. Handler N, Jaeger W, Puschacher H, Leisser K, Erker T. Synthesis of novel curcumin analogues and their evaluation as selective cyclooxygenase-1 (COX-1) inhibitors. *Chem. Pharm. Bull*. 2007;55:64-71.
17. Sons WJ. 2008. vero cell. *Curr protocol Microbiology*. Inggris.

18. Doyle A and JB Griffiths. Cell and Tissue Culture for Medical Research. New York: John Wiley & Sons. 2000.
19. Rachmayanti H. Uji Sitotoksik Fraksi Non Polar Ekstrak Etanol Kulit Kayu Srikaya (*Annona squamosa* L) Terhadap Sel T47D. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
20. Nogaki A, Satoh K, Iwasaka K, Takano H, Takahama M, Ida Y and Sakagami H. Radical intensity and cytotoxic activity of curcumin and gallic acid, *Anticancer Research*. 1998;18:(5A). 3487-91.
21. Zandia K, Ramedani E, Mohammadi K, Tajbakhsh S, Deilami I, Rastian Z, et.al.. Evaluation of Antiviral Activities of Curcumin Derivatives against HSV-1 in Vero Cell Line. *Natural Product Communications (NPC)*. 2010; 5(12): 1935 – 38.