



Cytotoxicity Test of Ethyl Acetate Fraction and Ethanol Fraction of Papaya Leaf Extract (*Carica papaya*. L) Against Hep-2 Laryngeal Cancer Cells

Lora PURNAMASARI

Postgraduate Students, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

Abstract

Papaya leaves as a medicine for fever, malaria, increased appetite, constipation, and anti-cancer. In the previous study using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ethanol extract of papaya leaf had an LC₅₀ value of 23.73 mg/ml. This suggests that the papaya leaves are a compound, which uses 70% ethanol extract of papaya leaves and has cytotoxic potential. Research objectives: This research aimed to determine the cytotoxic effect of ethanol and ethyl acetate fraction of 70 % ethanol extract of papaya leaf against Hep-2 cells. Performed in vitro by direct calculation method (viable cell count) so its LC₅₀ is known. Ethanol and ethyl acetate fraction of papaya leaf extract as a test solution was made in 5 concentrations, with concentrations of 20.93; 16.26; 12.64; 9.82, and 7.63 µg/ml. Result: The results obtained LC₅₀ ethanol fraction of 11.2616 µg/ml and the ethyl acetate fraction of LC₅₀ 12.4 of 882 µg/ml. Conclusion: Based on this it can be concluded that the fraction of ethanol and ethyl acetate extracts of papaya (*Carica papaya* L.) have cytotoxic properties against Hep-2 cells in a range that goes very, very toxic ie 5-50 µg/ml and has the potential to be developed as an anticancer drug.

Keywords: Cytotoxicity test, ethyl acetate fraction, ethanol fraction, papaya leaf extract, hep-2 laryngeal cancer cells

Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Etanol Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya*. L) terhadap Sel Kanker Laring Hep-2

Abstrak

Daun pepaya sebagai obat demam, malaria, penambah nafsu makan, sembelit, dan anti kanker. Pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ekstrak etanol daun pepaya memiliki nilai LC₅₀ sebesar 23,73 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa daun pepaya merupakan senyawa yang menggunakan 70% ekstrak etanol daun pepaya dan memiliki potensi sitotoksik. Berdasarkan potensi daun pepaya tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etanol dan etil asetat ekstrak etanol daun pepaya 70% terhadap sel Hep-2

yang dilakukan secara in vitro dengan metode perhitungan langsung (viable cell count) sehingga LC50 diketahui. Fraksi etanol dan etil asetat ekstrak daun pepaya sebagai larutan uji dibuat dalam 5 konsentrasi, dengan konsentrasi 20,93; 16,26; 12,64; 9,82, dan 7,63 µg/ml. Hasil diperoleh fraksi etanol LC50 sebesar 11,2616 µg/ml, dan fraksi etil asetat LC50 12,4 sebesar 882 µg/ml. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi etanol dan etil asetat ekstrak buah pepaya (*Carica papaya* L.) memiliki sifat sitotoksik terhadap sel Hep-2 dalam kisaran yang sangat-sangat toksik yaitu 5-50 µg/ml dan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Kata kunci: Uji sitotoksitas, fraksi etil asetat, fraksi etanol, ekstrak daun pepaya, sel kanker laring hep-2

Ucapan terimakasih: Terima kasih kepada seluruh pihak yang telah turut serta membantu proses hingga terselesaikannyaselesainya penelitian ini.

Untuk kutipan:

Purnamasri, L. (2025). Cytotoxicity Test of Ethyl Acetate Fraction and Ethanol Fraction of Papaya Leaf Extract (*Carica papaya*. L) Against Hep-2 Laryngeal Cancer Cells, *Radinka Journal of Health Science*, 3(2), 479-485.

Pendahuluan

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Kanker laring merupakan tumor yang terbanyak menyerang saluran pernapasan bagian atas. Kanker laring cukup sering ditemukan dibagian Telinga Hidung Tenggorokan (THT). Kanker laring atau tumor ganas laring menempati urutan pertama dalam urutan keganasan di bidang THT. Sedangkan di RSCM menempati urutan ketiga karsinoma nasofaring, tumor ganas hidung, dan sinus paranasal kanker laring lebih sering mengenai laki – laki dibandingkan perempuan, dengan perbandingan 5:1 terbanyak pada usia 56-69 tahun (Hermani 2001). Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan berbagai cara antara lain : operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi, kemoterapi serta yang sekarang berkembang adalah imunoterapi. Pengobatan ini ditunjukkan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan tubuh (Urivi 2002). Pengobatan kanker umumnya menggabungkan pembedahan dan radiasi dengan pengobatan kemoterapi (Katzung 1995). Langkah awal dalam pengobatan kanker adalah deteksi dengan benar bahwa gejala yang muncul pada tubuh pasien adalah benar-benar sel kanker ganas. Deteksi ini dilakukan dengan pemeriksaan biopsy, sehingga langkah pengobatan. bisa dilakukan secara tepat dan cepat. Langkah berikutnya adalah pengobatan dengan cara radioterapi dan kemoterapi. Namun pada kenyataannya pengobatan dengan cara ini memerlukan biaya yang mahal, selain itu juga memiliki efek samping yang dapat mempengaruhi sel-sel normal yang ada didalam tubuh.

Ketidakefektifan metode ini adalah kesulitan dalam mendesain senyawa kemoterapi yang mempunyai aktivitas antikanker dan mempunyai efek samping yang rendah terhadap sel normal (Naeem et al., 2022); (Zhong et al., 2021); (Rommasi, 2022); (Dehelean et al., 2021); (Banerjee et al., 2023). Sehingga diperlukan alternatif lain untuk mengobati penyakit kanker, antara lain dengan memanfaatkan sumber daya alam mengingat sumber bahan obat-obatan tersebut masih banyak tersebar di Indonesia. Tumbuh-tumbuhan merupakan salah satu sumber obat-obatan kemoterapi yang potensial sehingga sampai saat ini pencarian obat kemoterapi dari tumbuh-tumbuhan masih terus dilakukan. Daun pepaya merupakan salah satu sumber daya alam yang memiliki banyak manfaat, tetapi belum banyak digunakan dalam bidang pengobatan. Kandungan

kimia daun pepaya yang berkhasiat dalam pengobatan adalah enzim papain, alkaloid karpaina, pseudo- karpaina, glikosid, karposid dan saponin (Ayodipupo Babalola et al., 2024).

Senyawa alkaloid golongan piperidina yang memiliki aktivitas antikanker dengan menginduksi apoptosis adalah senyawa flavopiridol, yang merupakan senyawa hasil semisintesa dari alkaloid piperidina dengan senyawa flavonoid (Van Rootselaar et al., 2023). Tanaman pepaya berkhasiat sebagai antiinflamasi dari ekstrak akar pepaya (Xu et al., 2023); (Symma et al., 2021), antikanker dari ekstrak daun pepaya (Anilkumar & Bhanu P A, 2022); (Devanesan et al., 2021)

Data empiris ini didukung oleh penelitian sebelumnya tentang uji toksisitas ekstrak daun pepaya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada ekstrak etanol daun pepaya memiliki nilai LC50 23,73 µg/ml. Dengan demikian ekstrak etanol daun pepaya dikatakan toksik karena mempunyai nilai LC50 < 1000 µg/ml (Taychaworaditsakul et al., 2024); (Setiawan et al., 2022). Hasil pendahuluan ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun pepaya juga akan toksik apabila diujikan pada sel kanker sehingga berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker. Maka dari hasil penelitian tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui adanya efek sitotoksik dari daun pepaya (*Carica papaya*. L) pada fraksi etil asetat dan fraksi etanol yang dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker yaitu sel Hep-2. Sel Hep-2 adalah salah satu model sel kanker laring yang digunakan dalam penelitian. Dan pada penelitian ini metode yang digunakan yaitu metode perhitungan langsung (*Viabell cell account*).

Metode

Ekstraksi Daun Pepaya

Daun pepaya segar diambil, dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang melekat kemudian dicuci dengan air bersih dan dibuang bijinya, lalu dirajang kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka terlindung dari sinar matahari. Simplisia yang sudah kering kemudian diserbukkan dan diayak. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasinya itu dengan memasukkan 2,3 kg serbuk kering simplisia kedalam botol bermulut (maserator) kemudian ditambahkan etanol 70% kedalam botol sampai seluruh simplisia terendam, botol ditutup rapat. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simpisia terlarut, kemudian didiamkan selama 18 jam. Dipisahkan maserat dengan menggunakan kertas saring, diulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan dengan vakum *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga kental tetapi masih bias dituang. Kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 40 °C.

Fraksinasi Daun Pepaya

Untuk membuat fraksi etil asetat dan fraksi etanol daun pepaya masukkan 250 ml ekstrak kental yang masih dapat mengalir kedalam corong pisah. Kemudian di fraksinasi dengan pelarut n-Heksan dengan perbandingan (1:1), kocok selama ±15 menit. Setelah didiamkan beberapa lama terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan n-Heksan dengan lapisan etanol 70%. Lapisan n-Heksan (bagian atas) dipisahkan dengan membuka kran (corong) pisah sampai lapisan etanol habis. Diambil lapisan n-Heksan kemudian dipisahkan sebagai fraksi n-heksan. Lapisan etanol kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan (1:1), kocok selama ±15 menit. Setelah didiamkan beberapa lama terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan etil asetat (bagian atas) dan lapisan etanol 70% (bagian bawah). Lapisan etil asetat dan etanol dipisahkan dengan membuka kran corong pisah, perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat dan fraksi etanol diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm hingga kental tapi masih bisa dituang. Kemudian fraksi tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C

Pemanenan dan Penghitungan Sel Hep-2

Sel Hep-2 dicuci tiga kali dengan 10ml PBS. Ditambahkan 3ml PBS dan 1ml tripsin untuk melepaskan sel dari dinding *flask*. Sel dipindahkan kedalam tabung *conical* steril, ditambahkan

medium hingga 10 ml, suspensi sel disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh dibuang, supernatan disuspensikan dalam 10 ml media RPMI 1640 dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer dengan mencampurkan 20 μ l suspensi sel dengan 180 μ l *tripan blue* di bawah mikroskop. Sebanyak 10 μ l campuran dipipet ditaruh pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung terisi larutan perlahan-lahan sampai penuh. Sel diamati dengan pembesaran 100 kali. Pembuatan Larutan Uji Fraksi Etil Asetat dan fraksi etanol dari ekstrak daun pepaya fraksi ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan DMSO 0,25% dalam labu ukur 10ml sehingga konsentrasi larutan induk 5000 μ g/ml. Dari larutan induk dipipet sebanyak 1ml dan ditambahkan pelarut 9ml sehingga diperoleh konsentrasi 500 μ g/ml dan kemudian dari larutan ini dibuat pengenceran dengan konsentrasi 20,93; 16,26; 12,64; 9,82; dan 7,63 μ g/ml untuk fraksi etil asetat dan fraksi etanol daun pepaya. Semua larutan uji dibuat dengan pengenceran bertingkat. Pembuatan larutan uji dilakukan secara aseptis di dalam LAF.

Uji Sitotoksitas dengan Metode Perhitungan Langsung.

Pada penelitian ini dibagi menjadi beberapa kelompok pengujian yaitu media ditambah sel sebagai kontrol negatif, sel ditambah pelarut DMSO 0,25% sebagai pelarut masing-masing dibuat 3 kali, dan pengujian larutan sampel uji sebanyak 5 konsentrasi 20,93; 16,26; 12,64; 9,82; dan 7,63 μ g/ml untuk fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Masing - masing dimasukkan ke dalam plate 96 sumuran sebanyak 100 μ l. Kemudian ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 μ l kedalam tiap sumuran, sehingga tiap sumuran berisi 200 μ l larutan. Seri kadar dilakukan tiga kali replikasi (triplo) untuk mendapatkan hasil yang lebih valid. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk menghitung jumlah sel tiap sumuran diambil medianya sebanyak 50 μ l kemudian ditambahkan 50 μ l larutan biru tripan. Setelah kurang lebih 3 menit diresuspensi diambil 10 μ l untuk dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*.

Pengolahan Data

Dari uji sitotoksitas fraksi etil asetat dan fraksi etanol daun pepaya dilakukan pengambilan data berupa perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati. Sel yang hidup akan tampak berwarna bening dan sel yang mati akan berwarna biru. Jumlah sel yang didapat dihitung persen kematiannya (Kwolek-Mirek & Zadrage-Tecza, 2014); (Chan et al., 2020); (Hu et al., 2022); (Dean et al., 2024).

Teknik Analisa Data

Persentase kematian sel dengan metode perhitungan langsung (viabel cell account). Persentase kematian yang di peroleh masing-masing konsentrasi diubah kedalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Dari data itu dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan persen kematian sel. Perhitungan dengan cara probit ini memasukan angka 5 sebagai probit kedalam regresi linier, hasil distribusi dan antilogaritma serta hasil tersebut merupakan nilai LC50.

Hasil dan Pembahasan

Hasil perolehan ekstraksi dan fraksinasi daun pepaya berbau khas, rasa pahit, pada fraksi etil asetat berwarna hijau kecoklatan dan pada fraksi etanol berwarna coklat kemerahan serta mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid, dan saponin. Senyawa flavopiridol yang merupakan senyawa hasil semisintesa dari alkaloid piperidina dengan senyawa flavonoid (Pu et al., 2023); (Keylor et al., 2015); . Susut pengeringan fraksi etanol daun pepaya sebesar 7,30 % dan susut pengeringan fraksi etil asetat sebesar 4,24 %. Hasil rendemen fraksi etanol 70% daun pepaya sebesar 3,24 % dan rendemen fraksi etil asetat sebesar 0,78 %.

Kepadatan sel yang dihitung dengan *haemocytometer*, diperoleh sebanyak 784 sel dengan

rata-rata 3,136 sel pada tiap bidang. Sehingga diperoleh kepadatan sel dengan jumlah $3,136 \times 10^6$ sel/ml, pada tiap-tiap sumuran dimasukkan sebanyak 100 μ l suspensi sel dengan kepadatan $0,63 \times 10^6$. Uji sitotoksik dengan perhitungan langsung dimana sel mendapatkan kelompok perlakuan sebagai berikut (Srivastava et al., 2018): fraksi etanol 70% sebagai larutan uji dibuat 5 konsentrasi. Sel ditambah media sebagai kontrol negatif, sel ditambah DMSO sebagai kontrol pelarut. Inkubasi dilakukan dalam waktu 24 jam. Persen kematian sel tertinggi dengan larutan uji fraksi etanol daun pepaya inkubasi 24 jam adalah 91,85 % dan pada fraksi etil asetat daun pepaya adalah 82,35 % masing-masing pada konsentrasi 20,93 μ g/ml.

Berdasarkan perhitungan persamaan regresi linear diperoleh nilai LC50 yaitu yang menyebabkan 50% kematian masing-masing fraksi, yaitu fraksi etanol daun pepaya sebesar 11,2616 μ g/ml dan fraksi etil asetat sebesar 12,4882 μ g/ml.

Tabel 1. Persentase kematian sel *Hep-2* pada fraksi etanol ekstrak daun pepaya

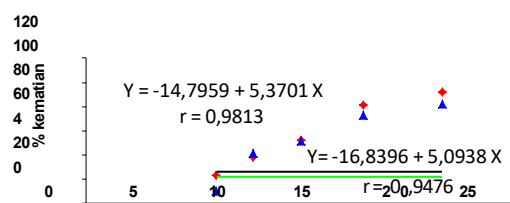
Konsentrasi (μ g/ml)	Log konsentrasi	% Kematian	Probit
20,93	1,3208	91,85	6,3984
16,26	1,2111	81,51	5,8965
12,64	1,1017	52,78	5,0702
9,82	0,9921	38,13	4,6971
7,63	0,8825	23,05	4,2644
Y = -0,2313 + 4,9747 X			
r = 0,9908			
LC 50 = 11,2616 μ g/ml			

Tabel 2. Persentase kematian sel *Hep-2* pada fraksi etil asetat ekstrak daun pepaya

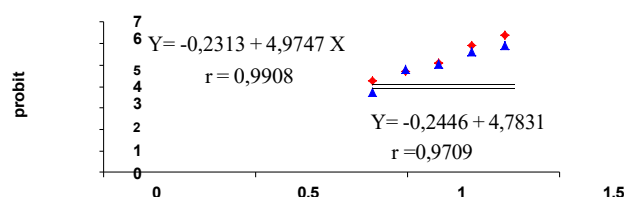
Konsentrasi (μ g/ml)	Log konsentrasi	% Kematian	Probit
20,93	1,3208	82,35	5,9307
16,26	1,2111	73,17	5,6189
12,64	1,1017	51,22	5,0301
9,82	0,9921	41,54	4,7853
7,63	0,8825	10,23	3,7298
Y = -0,2446 + 4,7831 X			
r = 0,9709			
LC 50 = 12,4882 μ g/ml			

Pengujian fraksi etil asetat dan fraksi etanol ekstrak daun pepaya bertujuan untuk mengetahui efektifitas pemberian fraksi etil asetat dan fraksi etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai senyawa sitotoksik. Metode kuantifikasi sel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode perhitungan langsung menggunakan *haemocytometer*. Pada larutan uji fraksi etil asetat dan fraksi etanol dari ekstrak daun pepaya diperoleh nilai LC50, yaitu pada fraksi etil asetat sebesar 12,4882 μ g/ml dan pada fraksi etanol sebesar 11,2616 μ g/ml. Berikut adalah grafik hubungan konsentrasi dengan persen kematian sel pada fraksi etil asetat dan fraksi etanol ekstrak daun pepaya dan juga grafik hubungan log konsentrasi dengan probit empirik pada fraksi etil asetat dan fraksi etanol ekstrak daun pepaya yang membentuk garis linier. *Grafik hubungan konsentrasi (μ g/ml) dengan persen kematian dan grafik hubungan log konsentrasi dengan probit (probit empirik)* Grafik hubungan log konsentrasi dengan probit (probit empirik) fraksi etanol dan etil asetat ekstrak

etanol 70% daun pepaya.



Gambar 1. Grafik hubungan konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dengan persen kematian



Gambar 2. Grafik hubungan log konsentrasi dengan probit (probit empirik) fraksietanol dan etil asetat ekstrak etanol 70% daun pepaya

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian *in vitro* ini, dapat disimpulkan bahwa fraksi etanol (LC50 11.2616 g/ml dan fraksi etil asetat (LC50 12.4882 g/ml) dari ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) menunjukkan sifat sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel kanker Hep-2, karena kedua nilai tersebut berada dalam rentang toksisitas 5-50 g/ml. Hasil ini memberikan implikasi signifikan bahwa daun pepaya memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai agen obat antikanker. Namun, keterbatasan penelitian ini adalah sifatnya yang masih *in vitro*, sehingga penelitian masa depan perlu difokuskan pada isolasi dan identifikasi senyawa aktif yang bertanggung jawab, penentuan mekanisme kematian seluler, serta validasi efikasi dan keamanan (toksisitas) fraksi ini melalui uji *in vivo*.

Daftar Pustaka

- Anilkumar, A., & Bhanu P A, A. (2022). In vitro anticancer activity of “Methanolic extract of papaya blackseeds” (MPB) in Hep G2 cell lines and its effect in the regulation of bcl-2, caspase-3, and p53 gene expression. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 4, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2021.100025>
- Ayodipupo Babalola, B., Ifeolu Akinwande, A., Otunba, A. A., Ebenezer Adebami, G., Babalola, O., & Nwifo, C. (2024). Therapeutic benefits of *Carica papaya*: A review on its pharmacological activities and characterization of papain. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(1), 105369. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105369>
- Banerjee, S., Nau, S., Hochwald, S. N., Xie, H., & Zhang, J. (2023). Anticancer properties and mechanisms of botanical derivatives. *Phytomedicine Plus*, 3(1), 100396. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100396>
- Chan, L. L.-Y., Rice, W. L., & Qiu, J. (2020). Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLOS ONE*, 15(1), e0227950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227950>
- Dean, I., Lee, C. Y. C., Tuong, Z. K., Li, Z., Tibbitt, C. A., Willis, C., Gaspal, F., Kennedy, B. C., Matei-Rascu, V., Fiancette, R., Nordenvall, C., Lindforss, U., Baker, S. M., Stockmann, C., Sexl, V., Hammond, S. A., Dovedi, S. J., Mjösberg, J., Hepworth, M. R., ... Withers, D. R.

- (2024). Rapid functional impairment of natural killer cells following tumor entry limits anti-tumor immunity. *Nature Communications*, 15(1), 683. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44789-z>
- Dehelean, C. A., Marcovici, I., Soica, C., Mioc, M., Coricovac, D., Iurciuc, S., Cretu, O. M., & Pinzaru, I. (2021). Plant-Derived Anticancer Compounds as New Perspectives in Drug Discovery and Alternative Therapy. *Molecules*, 26(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/molecules26041109>
- Devanesan, S., Jayamala, M., AlSalhi, M. S., Umamaheshwari, S., & Ranjitsingh, A. J. A. (2021). Antimicrobial and anticancer properties of Carica papaya leaves derived di-methyl flubendazole mediated silver nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*, 14(5), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.004>
- Hu, C., He, S., Lee, Y. J., He, Y., Kong, E. M., Li, H., Anastasio, M. A., & Popescu, G. (2022). Live-dead assay on unlabeled cells using phase imaging with computational specificity. *Nature Communications*, 13(1), 713. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28214-x>
- Keylor, M. H., Matsuura, B. S., & Stephenson, C. R. J. (2015). Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chemical Reviews*, 115(17), 8976–9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>
- Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., & Zheng, Q. (2022). Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, 27(23), 8367. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>
- Pu, M.-X., Guo, H.-Y., Quan, Z.-S., Li, X., & Shen, Q.-K. (2023). Application of the Mannich reaction in the structural modification of natural products. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2235095. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2235095>
- Rommasi, F. (2022). Bacterial-Based Methods for Cancer Treatment: What We Know and Where We Are. *Oncology and Therapy*, 10(1), 23–54. <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00177-x>
- Setiawan, H., Hikmawati, A. S. A., Wulandari, S. W., Malinda, E. V., & Putra, I. L. I. (2022). Effect of Calina Papaya Leaves Extract on Respiratory Tract in Cigarette Smoke Exposed Rats. *Jurnal Biodjati*, 7(2), 189–198. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v7i2.19068>
- Srivastava, G. K., Alonso-Alonso, M. L., Fernandez-Bueno, I., Garcia-Gutierrez, M. T., Rull, F., Medina, J., Coco, R. M., & Pastor, J. C. (2018). Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation. *Scientific Reports*, 8(1), 1425. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19428-5>
- Symma, N., Bütergerds, M., Sendker, J., Petereit, F., Hake, A., Düfer, M., & Hensel, A. (2021). Novel Piperidine and 3,4-dihydro-2H-pyrrole Alkaloids from Tilia platyphyllos and Tilia cordata Flowers. *Planta Medica*, 87(09), 686–700. <https://doi.org/10.1055/a-1340-0099>
- Taychaworaditsakul, W., Saenjurn, C., Lumjuan, N., Chawansuntati, K., Sawong, S., Jaijoy, K., Na Takuathung, M., & Sireeratawong, S. (2024). Safety of Oral Carica papaya L. Leaf 10% Ethanol Extract for Acute and Chronic Toxicity Tests in Sprague Dawley Rats. *Toxics*, 12(3), 198. <https://doi.org/10.3390/toxics12030198>
- Van Rootselaar, S., Peterse, E., Blanco-Ania, D., & Rutjes, F. P. J. T. (2023). Stereoselective Mannich Reactions in the Synthesis of Enantiopure Piperidine Alkaloids and Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, 26(22), e202300053. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202300053>
- Xu, F.-F., Chen, J.-Q., Shao, D.-Y., & Huang, P.-Q. (2023). Catalytic enantioselective reductive alkynylation of amides enables one-pot syntheses of pyrrolidine, piperidine, and indolizidine alkaloids. *Nature Communications*, 14(1), 6251. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41846-x>

Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>