

EKSTRAK ETANOLIK HERBA CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.) BEREFEK SITOTOKSIK DAN MENGINDUKSI APOPTOSIS PADA SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

Fitria, M., Armandari, I., Septhea, D.B. Ikawati, A.H.M., dan Meiyanto, E.

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
E-mail: meiyant_e@ugm.ac.id

ABSTRAK

Potensi sitotoksik Ciplukan (*Physalis angulata* L.) dan kemampuannya memacu apoptosis pada beberapa sel kanker perlu diteliti. Untuk itu, ekstrak etanol herba ciplukan (EC) diaplikasikan pada sel kanker payudara MCF-7 untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pemacuan apoptosis IC_{50} dengan menggunakan metode MTT dan pengecatan DNA dengan akridin oranye-etidium bromida (*double staining*) untuk mengamati terjadinya apoptosis. Perolehan IC_{50} sebesar 187 $\mu\text{g/mL}$ dan terjadinya apoptosis pada sel kanker MCF-7 membuktikan kemampuan EC sebagai agen sitotoksik.

Kata kunci: Etanol ekstrak herba Ciplukan,, sel kanker MCF-7, sitotoksik, apoptosis.

EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF CIPLUKAN HERBS (*Physalis angulata* L.) ON CYTOTOXIC AND APOPTOSIS INDUCTION IN MCF-7 BREAST CANCER CELL LINES

ABSTRACT

Cyto-toxic potent of Ciplukan (*Physalis angulata* L.) and its capacity to induce apoptosis on several cancer cells need to be investigated. Therefore, ethanolic extract (EC) of Ciplukan herbs has been applied on breast cancer cells of MCF-7 to determine its effect in apoptosis induction at IC_{50} using MTT method as well as double staining using *acrydin orange-ethidium bromide* method to observe the occurrence of apoptosis. The gain of IC_{50} of 187 $\mu\text{g/mL}$ and occurrence of apoptosis obtained from double staining method on MCF-7 cancer cell lines indicated the capacity of EC as cyto-toxic agents.

Key words: Ethanolic extract of Ciplukan herbs, MCF-7 cancer cell lines, cytotoxic, apoptosis.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker karsinoma yang menyerang pada jaringan epitelial payudara. Lebih dari 20 tahun, insidensi kanker payudara di Amerika Serikat mengalami peningkatan dari 25.000 menjadi 44.000 kasus tiap tahun (Dowsett, 2008). Untuk mengatasi tingginya insidensi penyakit kanker payudara ini, maka upaya-upaya untuk penemuan dan pengembangan pengobatan kanker harus terus diupayakan. Cara yang telah banyak dilakukan untuk mengobati kanker antara lain pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi hormon atau terapi antibodi monoclonal. Namun efek samping toksik pada jaringan normal dan resistensi sel kanker seringkali terjadi dengan cara pengobatan ini (Tyagi *et al.*, 2004).

Alternatif pengobatan kanker yang dapat dilakukan untuk mengurangi efek samping dari pengobatan di atas serta lebih aman untuk digunakan adalah melalui penggunaan tanaman obat. Ciplukan, merupakan salah satu tanaman yang telah banyak diteliti mempunyai efek sitotoksik dan mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Ciplukan mengandung saponin, flavonoid, polyphenol, dan physalin (Shingu, 1992) yang berperan dalam penghambatan sel kanker. Senyawa-senyawa saponin telah diketahui dapat menghambat pembentukan Bcl-2 yang diekspresikan terlalu tinggi, menginduksi protein caspase-3 yang diekspresikan terlalu rendah, meningkatkan ekspresi p53, dan dapat pula memicu G_1 cell cycle arrest (Raju & Rao, 2004).

Flavonoid dapat menurunkan enzim xantin oksidase, siklooksigenase (COX),

dan lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam pro-oksidasi sehingga akan menunda siklus sel (Ren *et al.*, 2003). Selain senyawa-senyawa tersebut, ciplukan juga mengandung fisalin yang merupakan senyawa aktif dalam menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker (Chiang *et al.*, 1992). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menguji aktivitas dari herba ciplukan ini. Penelitian Wu *et al.* (2004) menunjukkan herba ciplukan mempunyai aktivitas anti hepatoma pada sel hepatoma manusia Hep G2, Hep 3B dan PLC/PRF/5. Magalhães *et al.* (2006) juga menunjukkan bahwa fisalin B dan fisalin D yang diisolasi dari bagian aerial *Physalis angulata* memberikan aktivitas sitotoksik pada beberapa sel kanker baik *in vitro* maupun *in vivo*. Fisalin B dan F yang diisolasi dari ekstrak etanolik herba ciplukan juga mampu menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker leukemia (Chiang *et al.*, 1992).

Adanya aktivitas sitotoksik pada ciplukan dapat disebabkan salah satunya dengan mekanisme apoptosis. Apoptosis merupakan program bunuh diri sel. Sel-sel yang terapoptosis akan mengalami pengerutan sel, kerusakan membran plasma, dan terjadinya kondensasi kromatin. Jika apoptosis suatu sel telah selesai, maka akan tertinggal kepingan sel yang mati yang akan dikenali dengan sel-sel makrofag dan di fagositosis (*engul-fed*) (Ricci & Zong, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Heisch *et al.* (2006) membuktikan bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB 231.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak etanolik herba ciplukan juga mempunyai aktivitas sitotoksik serta mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.

BAHAN DAN METODE

Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (EC)

Herba ciplukan diperoleh dari daerah Sleman Yogyakarta. Herba yang telah diperoleh kemudian dikeringkan dan diserbuk, dan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* (Heidolph WB 2000-Gast USA).

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* (Heidolph WB 2000-Gast USA).

Kultur Sel

Sel kanker payudara MCF-7 didapatkan dari koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada yang ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco).

Uji Sitotoksisitas

Sel MCF-7 yang telah konfluen di panen dan didistribusikan ke dalam sumuran pada *96-well microplate* (Nunc) dengan jumlah 5000 sel/sumuran. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5% (Heraeus) dengan suhu 37°C untuk adaptasi sehingga sel menempel di dasar sumuran dan siap untuk perlakuan.

Selanjutnya media diambil, dicuci dengan PBS (Phosphate Buffer Saline) lalu ditambahkan larutan uji dalam berbagai seri konsentrasi sebanyak 3 replikasi dengan kadar DMSO (Sigma) tidak lebih dari 0.6% dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Sebagai kontrol digunakan kontrol pelarut (DMSO), kontrol sel MCF-7, dan kontrol media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco). Pada akhir inkubasi, media kultur yang ada dalam plate dibuang, kemudian dicuci dengan PBS untuk tiap sumuran. Selanjutnya masing masing sumuran ditambah 100 μ l MTT (0,5 mg/ml) (Sigma).

Inkubasi dilanjutkan selama 3 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan. Sel yang hidup akan mengkonversikan MTT menjadi formazan yang berwarna biru tua. Selanjutnya, pereaksi stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl ditambahkan untuk melarutkan kristal formazan dan sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, plate digoyang dengan horizontal shaker (MRK-RETAC) selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader (SLT 240 ATC) pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absor-

bansi yang terbaca dikonversikan dalam prosentase kehidupan.

Uji Apoptosis

Cover slip (Nunc) ditanam ke dalam 24 well plate dan sel didistribusikan di atasnya. Kepadatan sel yang digunakan adalah 5×10^4 sel/well dalam 1000 μL media kultur. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO_2 (Heraeus) agar sel teradaptasi kembali. Selanjutnya sel diberi perlakuan IC_{50} ekstrak dan kontrol sel. Pada akhir inkubasi, media kultur DME M (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) dicuci dengan PBS, dan cover slip diangkat dari sumuran serta diletakkan di atas obyek gelas lalu ditetesi dengan akridin oranye (Sigma) - etidium bromida (Sigma) sebanyak 10 μL . Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mikroskop fluoresens (Zeiss MC 80) menggunakan perbesaran 10 x 10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Tanaman

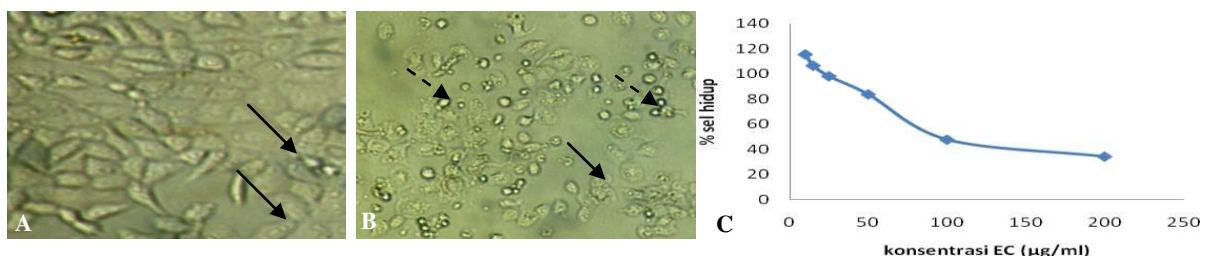
Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah benar tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.). Hal ini penting dilakukan untuk menghindari kesalah-

lahan dalam pengumpulan tanaman yang akan digunakan sebagai bahan uji. Tanaman ciplukan diperoleh dari daerah Sleman Yogyakarta dan dilakukan identifikasinya di Laboratorium Farmakognosi, bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar ciplukan (*Physalis angulata* L.).

Efek Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (EC) pada Sel Kanker Payudara MCF-7

Ciplukan merupakan salah satu bahan alam yang mempunyai banyak komponen aktif diantaranya saponin, flavonoid, polyphenol, dan physalin (Shingu, 1992). Komponen-komponen ini dapat memberikan aktivitas farmakologi termasuk efek sitotoksik. *MTT assay*, merupakan metode yang dipilih untuk menentukan efek sitotoksik dari EC pada sel kanker payudara MCF-7 ini. Pada metode ini, sel hidup akan mereduksi MTT menjadi garam formazan yang akan berwarna biru gelap dan dapat diukur panjang gelombangnya pada $\lambda = 595$ nm. Intensitas warna yang terbaca akan sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Selanjutnya absorbansi dikonversikan kedalam menjadi % sel hidup dengan rumus:

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



Gambar 1. Efek Perlakuan Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan(EC) terhadap sel kanker MCF-7. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10^3 sel MCF7 selama 24 jam dan kemudian diberi perlakuan dengan berbagai seri konsentrasi EC 10-200 $\mu\text{g/ml}$. Viabilitas sel ditentukan dengan metode MTT dan morfologi sel diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Kontrol sel (A). Perlakuan EC dengan kadar 100 $\mu\text{g/ml}$ (B). Grafik hubungan % sel hidup versus konsentrasi EC (C). Setiap titiknya menunjukkan rata-rata dari tiga replikasi. Sel hidup (—▶), sel mati (- - -▶).

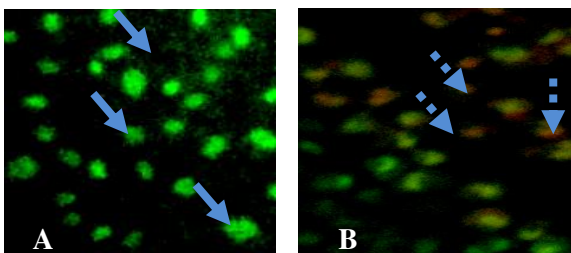
Dari % sel hidup ini lalu dilakukan perhitungan IC_{50} . IC_{50} merupakan gambaran efek sitotoksik yang diberikan EC, yaitu kadar yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EC tunggal memberikan efek sitotoksik dengan harga IC_{50} sebesar 118 $\mu\text{g/ml}$.

Perlakuan dengan EC pada sel kanker payudara MCF-7 memberikan pengaruh pada morfologi sel. Sel yang hidup tampak berbentuk daun dan tetap mengapung pada dasar sumuran (Gambar 1 A), sedangkan sel yang telah mengalami kematian tampak berbentuk bulat dan mengapung (Gambar 1 B). Pemberian EC juga menunjukkan fenomena *dose-dependent* di mana % sel hidup terus berkurang seiring bertambahnya dosis (Gambar 1 C). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EC dapat menginduksi terjadinya kematian sel pada sel kanker payudara MCF-7. Dengan harga IC_{50} yang cukup baik yaitu 187 $\mu\text{g/ml}$, maka EC berpotensi untuk dijadikan salah satu alternatif dalam pengobatan kanker payudara (Tyagi *et al.*, 2004).

Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (EC) menginduksi Apoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF

Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel yang berkontribusi pada proses pathogenesis pada suatu penyakit atau penghilangan sel pada organisme dewasa (Wu *et al.*, 2009).

Hal ini menunjukkan bahwa apoptosis mempunyai efek yang amat besar dalam pengembangan terapi kanker uji apoptosis dilakukan dengan pengecatan menggunakan akridin orange etidium bromide. Sel yang mati akan ditunjukkan dengan fluoresensi orange dan sel yang hidup ditunjukkan dengan fluoresensi hijau (Gambar 2.).



Gambar 2. Efek perlakuan EC pada sel kanker payudara MCF-7 dengan menggunakan metode *double staining*. Pengecatan dilakukan dengan menggunakan Akridin oranye-Etidium bromid dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 10x10. Kontrol sel (A). Sel yang mengalami apoptosis setelah diberi perlakuan EC dengan kadar (B). Sel hidup berfluoresensi hijau (→) sedangkan sel yang mati berfluoresensi oranye (●●●▶).

Kelompok perlakuan menggunakan EC menunjukkan adanya aktivitas apoptosis (Gambar 2 B), sedangkan pada kelompok kontrol tidak terlihat adanya aktivitas apoptosis (Gambar 2 A). Adanya aktivitas apoptosis pada kelompok perlakuan ini disebabkan karena sel mengalami kerusakan membran akibat pemberian EC sehingga etidium bromid yang digunakan untuk mewarnai sel dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluoresensi orange.

Sedangkan pada kelompok kontrol sel, membran sel masih dalam keadaan utuh sehingga etidium bromide tidak bisa masuk ke dalam sel dan hanya akridin orange yang bisa masuk sehingga fluoresensi yang ditimbulkan berwarna hijau. Hasil pengecatan ini membuktikan bahwa EC mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa IC_{50} EC pada sel kanker payudara MCF-7 sebesar 118 $\mu\text{g/mg}$. Grafik hubungan konsentrasi EC versus sel hidup menunjukkan terjadi fenomena *dose dependent*, yaitu semakin besar konsentrasi EC yang diberikan, maka % sel hidup akan semakin rendah. Pada konsentrasi EC rendah (10-25 $\mu\text{g/mg}$), EC belum memberikan efek yang berarti yang ditunjukkan dengan % sel hidup masih di atas 80%. Perubahan morfologi sel mulai tampak pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mg}$ dimana pada konsentrasi ini mulai banyak sel yang mengalami kematian dengan morfologi sel bentuk bulat dan me-

ngapung, dan pada konsentrasi yang lebih besar lagi (100 dan 200 µg/mg), jumlah sel yang mengalami kematian semakin banyak.

Dari sini dapat ditarik kesimpulan bahwa EC cukup berpotensi dalam menghambat kehidupan sel. Mekanisme sitotoksik EC pada sel MCF-7 kemungkinan dapat terjadi melalui berbagai jalur, antara lain melalui induksi apoptosis atau dengan menghambat siklus sel pada fase-fase tertentu sehingga proses proliferasi sel dapat terhambat.

Salah satu cara untuk menelusuri mekanisme kematian yang disebabkan oleh EC adalah dengan menggunakan *double staining*. Metode ini mampu mendeteksi sel-sel yang mengalami apoptosis. Hasil uji menunjukkan sel-sel yang diberi perlakuan dengan EC mengalami fluoresensi berwarna oranye dengan DNA terfragmentasi yang berarti sel mengalami apoptosis. Hal ini mengindikasikan bahwa salah satu mekanisme EC pada sel kanker payudara MCF-7 adalah melalui induksi apoptosis. Namun, mekanisme molekular tentang pemacuan apoptosis EC pada sel MCF-7 belum diketahui secara jelas.

Ekstrak etanolik herba ciplukan pernah diuji aktivitasnya pada sel kanker Hep G₂. Hasil uji menunjukkan bahwa EC mampu meningkatkan ekspresi p53, menurunkan ekspresi Bcl-2, serta meningkatkan protein pro apoptosis Bax dan Bad (Wu *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa di dalam sel, EC mampu berikatan dengan reseptor-reseptor yang dapat meregulasi protein-protein tersebut. MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mempunyai karakteristik yang mirip dengan Hep G₂, dimana sel kanker jenis ini mengekspresikan *wildtype* p53 serta over-ekspresi Bcl-2 (Amundson *et al.*, 2000) sehingga kemungkinan mekanisme pemacuan apoptosis oleh EC yang terjadi pada sel MCF-7 mirip dengan mekanisme yang terjadi pada sel Hep G₂.

Dilain pihak, beberapa penelitian membuktikan bahwa pemberian diosgenin (suatu senyawa turunan steroid) pada MCF-7 dapat mereduksi potensial membran mitokondria sel, meregulasi ekspresi Bcl-2 dan menginduksi p53 (Ardelean & George-Ciprian,

2008; Sowmyalakshmi *et al.*, 2005). Fisalin yang merupakan senyawa aktif dalam EC juga merupakan senyawa steroid (Kawai *et al.*, 2001) sehingga kemungkinan mekanisme yang terjadi antara fisalin dan diosgenin juga sama. Namun, penelusuran mekanisme dan protein yang terlibat harus diteliti lebih lanjut. Dari hasil penelitian dan beberapa kesamaan yang ada, maka dapat disimpulkan bahwa kemungkinan mekanisme pemacuan apoptosis oleh EC pada sel kanker payudara MCF-7 adalah melalui penghambatan ekspresi protein Bcl-2 serta peningkatan ekspresi p53.

Bcl-2 merupakan salah satu jenis protein anti apoptosis yang apabila ekspresi Bcl-2 ini dapat dihambat, maka proses apoptosis dapat terjadi. Faktor transkripsi dari Bcl-2 adalah NF_κB dari *downstream* P13K/Akt (Simstein *et al.*, 2003). Ekstrak etanolik herba ciplukan kemungkinan bekerja pada jalur ini sehingga Bcl-2 tidak dapat terekspresi. Terhambatnya ekspresi Bcl-2 ini selanjutnya akan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria kemudian menginduksi jalur caspase. Karena sel kanker payudara MCF-7 mengalami delesi gen *CASP-3* (Liang *et al.*, 2001), maka kemungkinan proses apoptosis akan terjadi melalui sekuen caspase 6,7 dan 9. Kemungkinan mekanisme lain yaitu melalui peningkatan ekspresi p53.

Peningkatan protein p53 ini akan menginduksi ekspresi protein proapoptosis misalnya Bad dan Bax yang akan mengikat Bcl-2 yang ada dipermukaan mitokondria. Selanjutnya terikatnya Bcl-2 oleh Bad atau Bax ini akan memicu keluarnya sitokrom c dari mitokondria dan sama seperti mekanisme sebelumnya, akan terjadi aktivasi jalur caspase dan terjadi proses apoptosis.

Kemampuan EC yang mampu memberikan efek sitotoksik dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 memungkinkan EC untuk dikembangkan menjadi agen kemopreventif yang potensial. Namun, studi lanjutan seperti imunositokimia perlu dilakukan untuk mengetahui protein-protein yang terlibat dalam mekanisme molekular EC sekaligus membuktikan kebenaran kemungkinan mekanisme yang diungkapkan. Lebih lanjut, EC juga

dapat didesain untuk dikombinasikan dengan agen kemoterapi karena kebanyakan kemoterapi memberikan efek toksik pada jaringan normal dan resistensi pada sel kanker (Tyagi *et al.*, 2004; Davis, 2002).

Jika berefek sinergis, maka EC dapat digunakan sebagai pendamping agen kemoterapi sehingga dapat mengurangi dosis pemakaian yang berarti efek samping akibat penggunaan kemoterapi pun akan berkurang. Pengujian juga dapat dikembangkan dengan menguji efek sitotoksik EC pada sel normal sehingga dapat dipastikan bahwa EC tidak memberikan efek toksik pada sel normal. Jika uji ini memberikan hasil yang baik, maka dimasa mendatang EC dapat menjadi alternatif pengobatan kanker yang potensial aman, dan murah.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan memberikan efek sitotoksik dan mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 sehingga ekstrak etanolik dapat dikembangkan menjadi salah satu alternatif dalam pengobatan kanker payudara.

DAFTAR PUSTAKA

- Amundson S.A, Myers T.G, Scudiero D. Kitada S, Reed J.C, & Fornace A.J. 2000. An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res*, 60:6101–6110.
- Ardelean A, & George-Ciprian PRIBAC. 2008. Diosgenin, the Active Principle of *Trigonella* sp. Extract may Induce Apoptosis on MCF-7 Cancer Cells through Caspase Activation. *ANUL IV, NR, 3* (14).
- Chiang HC, Jaw S.M, & Chen P.M. 1992. Inhibitory Effect of Fisolin B and Fisolin F on Various Human Leukimia Cells in vitro. *Anticancer Res*, 12 (4): 1155-62
- Davis M.A. 2002. *Apoptosis Methods in Pharmacology and Toxicology: Approaches to Measurement and Quantification*. Humana Press Inc, New Jersey.
- Dowsett M. 2008. Introduction to Sessions on 'Predicting personal risk for breast-cancer. *Breast Cancer Research*, 10, London, UK.
- Heisch W.T, Huang KY, Lin H.Y, & Chung J.G. 2006. Physalis Angulata Induced G2/M Phase Arrest in Human Breast Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol*, 44: 974-983.
- Kawai M., Yamamoto T., Makino B., Yamamura H., Araki S, Butsukan G., & Saito K. 2001. The Structure of Physalin T from *Physalis Alkekengi* var. *franchetti*. *J Asian Nat Prod Res*, 3(3):199-205.
- Liang, Y., Yan C., & Schor N.F. 2001. Apoptosis in The Absence of Caspase 3. *Oncogene*, 20: 6570–6578
- Magalhães, Hemerson I.F, Veras, Maria L, Torres, Mária R, Alves, Ana P.N.N, Pessoa, Otilia D.P, Silveira, Ediberto R, Costa-Lotufo, Leticia V, de Moraes, Manoel O, & Pessoa, Cláudia. 2006. In-vitro and In-vivo Antitumor Activity of Fisolin B and D from *Physalis angulata*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58th Ed, 235-241(7)..
- Raju & Rao. 2004. Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graceum* (Fenugreek). Inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention*, 13: 1392.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., & Zhang L. Flavonoids. 2003. Promising Anti cancer Agents. *Med Res Rev*, 23(4): 519-534.

- Ricci M.S, & Zong, W.X. 2006. Chemo-therapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist*, 11:342–357. *Mol. Med.*, 110, 173-183.
- Shingu K. 1992. Three New Withanolides, Physagulins E, F and G from *Physalis angulata* L. *Chem Pharm Bull*, 40, 2448-2451.
- Simstein R., Burow M., Parker A., Weldon C., & Beckman B. 2003. *Apoptosis, Chemo- resistance, dan Breast Cancer: Insights from The MCF7 Cell Model System. Exp Biol Me*, 228:995–1003.
- Sowmyalakshmi S., Ranga R., C. Gary G., & Damodaran C. 2005. *Effect of Diosgenin (Fenugreek) on Breast Cancer Cells*. Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46.
- Tyagi A.K, Agarwal C., Chan D.C.F., & Agarwal R. 2004. Synergistic Anti Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin dan Carboplatin against Human Breast Carcinoma MCF-7 dan MDA-MB468 Cells. *Oncology Reports*, 11:493-499.
- Wu S, L.. Ng, D.Lin., S.Huang., S.Wang, & C.Lin. 2009. Extract Induces Apoptosis in Human Hep G2 Cells through CD95/CD95L system and the Mitochondrial Signaling Transduction Pathway. *Cancer Letters*, 215(2):199-208.
- Wu, Ng, Chen Lin, & Wang Lin. 2004. Antihepatoma Activity of *Physalis Angulata* & *P. Peruviana* Extracts and Their Effects on Apoptosis in Human Hep G2 Cells. *Life Sci*, 74(16):2061-73.