

## EKSTRAK ETANOLIK HERBA CIPLUKAN (*Physalis Angulata L.*) MENURUNKAN PROLIFERASI SEL PAYUDARA TIKUS BETINA GALUR SPRAGUE DAWLEY TERINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ[a]ANTRASEN (DMBA)

Ameilinda Monikawati, Sofa Farida, Laras Widawaty P  
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada,

### ABSTRAK

Ciplukan (*Physalis angulata L.*) merupakan salah satu tanaman yang telah digunakan dalam terapi kanker. Ciplukan telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik pada beberapa sel kanker, mampu menghambat proliferasi sel, dan menginduksi cell cycle arrest. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiproliferatif ekstrak etanolik herba ciplukan (EHC) dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB secara *in vivo* pada tikus betina galur Sprague Dawley yang terinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthrasen (DMBA) melalui pengamatan histopatologi sel payudara dengan metode pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE), serta aktivitas antiproliferasi EHC dengan metode AgNOR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfologi sel epitel kelenjar payudara kelompok EHC 1500 mg/kgBB berbeda jika dibandingkan dengan kelompok DMBA dimana bagian ductus menjadi multilayer yang memperlihatkan adanya indikasi karsinogenesis, sehingga EHC mampu menghambat proses karsinogenesis tikus terinduksi DMBA. EHC1500 mg/kgBB juga menunjukkan aktivitas antiproliferatif dengan menurunkan jumlah black dots dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA yang berarti perlakuan ekstrak etanolik herba ciplukan menurunkan tingkat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa EHC memiliki aktivitas kemoprevensi kanker payudara melalui penghambatan proliferasi sel serta berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada kanker payudara.

**Kata Kunci :** *Physalis angulata*, kanker payudara, antiproliferasi, 7,12-dimethylbenz [a] anthracene

### PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang mempunyai prevalensi tinggi dan menduduki peringkat kedua di dunia sebagai penyebab kematian pada wanita setelah kanker serviks (1). Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan kedua kanker yang menyerang wanita Indonesia dengan insidensi lebih dari 20.000 kasus per tahun (2). Angka ini akan terus mengalami peningkatan apabila tidak diimbangi dengan usaha penemuan agen antikanker payudara. Proliferasi sel memegang peranan penting pada peristiwa karsinogenesis. Oleh karena itu, kontrol terhadap proliferasi sel terus diupayakan dalam usaha pencegahan, penemuan dan pengembangan pengobatan kanker payudara.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa senyawa-senyawa dalam tanaman memiliki

potensi sebagai agen kemopreventif sehingga dapat mengurangi resiko kanker (3). Salah satu herba yang menarik untuk ditelusuri aktivitasnya sebagai agen kemopreventif adalah ciplukan (*Physalis angulata L.*). Ekstrak etanolik herba ciplukan (EHC) terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 dengan  $IC_{50}$  118  $\mu\text{g/ml}$  (4), dan sel T47D dengan  $IC_{50}$  160  $\mu\text{g/ml}$  (5). Ekstrak metanolik ciplukan juga memiliki efek antiproliferasi, memacu G2/M arrest, dan apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB 231 dan MCF-7 (6) serta mempunyai aktivitas antihepatoma pada sel hepatoma manusia Hep G2, Hep 3B, dan PLC/PRF/5 (7). Ekstrak kloroform ciplukan juga terbukti mampu menghambat proliferasi sel adenokarsinoma paru NCI-H23 (8). Fisalin B dan fisalin D yang diisolasi dari ciplukan juga memiliki aktivitas sitotoksik pada beberapa sel

kanker (9,10). Fisalin B dan F yang diisolasi dari herba ciplukan juga mampu menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker leukemia (11). Penelitian-penelitian di atas menunjukkan bahwa ciplukan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif.

Oleh karena itu, untuk mengoptimalkan potensi ciplukan sebagai agen kemopreventif terutama pada kanker payudara, maka dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak etanolik herba ciplukan (EHC) pada gambaran histopatologi sel payudara tikus betina galur Sprague Dawley yang terinduksi 7,12-Dimetilbenz[*a*]antrasena (DMBA). Selain itu, juga dilakukan penelitian tentang aktivitas antiproliferatif EHC pada sel payudara tikus terinduksi DMBA. Melalui penelitian ini, akan diperoleh data-data ilmiah yang dapat dijadikan dasar pengembangan ekstrak etanolik herba ciplukan sebagai agen kemopreventif yang potensial, khususnya dalam terapi kanker payudara.

## TUJUAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh EHC pada gambaran histopatologi sel epitel payudara tikus dan aktivitas antiproliferasi EHC pada sel payudara tikus betina galur Sprague Dawley terinduksi DMBA.

## METODE PENELITIAN

### Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan desain penelitian *post test only control group design*, dimana variabel tergantung yang diamati meliputi perubahan histopatologi dan aktivitas antiproliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus yang terinduksi DMBA akibat perlakuan EHC dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB.

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama empat bulan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2010 di Laboratorium *Cancer Chemoprevention Re-*

*search Center* Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.

### Bahan Tanaman dan Preparasi Ekstrak

Bahan uji dalam penelitian ini adalah herba ciplukan yang diambil dari daerah Sleman, Yogyakarta pada bulan Januari 2010 dan dideterminasi di laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Herba ciplukan kemudian di serbuk dan diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan larutan penyari etanol (Merck). Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

### Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah Tikus galur Sprague Dawley umur 40-50 hari dengan berat antara 70-120 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM sebanyak 6 ekor tiap kelompok di tempatkan dalam kandang dengan suhu sekitar 28-32°C, kelembaban nisbi 98%, dan diberi makanan pelet serta diberi minum air ledeng.

### Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah Etanol (Merck, Darmstadt), CMC-Na 0,5% sebagai pelarut ekstrak, 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasena atau DMBA (Sigma) untuk induksi kanker, *corn oil* sebagai pelarut DMBA, aquadest (Asia Lab), formaldehid (Sigma) sebagai larutan fiksasi organ, larutan pewarna Hematoksilin-Eosin, larutan perat nitrat 25% dan asam formiat 1% untuk pengecatan AgNOR, serta NaCl 0,9%.

### Prosedur Penelitian

#### *Uji In Vivo*

Tikus dibagi dalam lima kelompok masing-masing enam ekor setiap kelompok. Kelompok I (kontrol DMBA) diberi perlakuan DMBA 20 mg/kgBB dalam pelarut *corn oil*, kelompok II diberi perlakuan DMBA dan EHC dosis 750 mg/kg BB, kelompok III diberi

perlakuan DMBA dan EHC dosis 1500 mg/kg BB, kelompok IV adalah kontrol EHC (1500 mg/kg BB), sedangkan kelompok V adalah kontrol pelarut CMC-Na 0.5 %.

Pemejian DMBA dilakukan 10 kali selama lima minggu pada kelompok I, II, dan III. Empat minggu kemudian, tikus dipejani EHC setiap hari selama satu minggu. Selanjutnya tikus dikorbankan dengan dislokasi leher dan dilakukan nekropsi. Organ payudara diisolasi dan dibuat preparat untuk analisis histopatologinya dengan pengecatan Hematoksin-Eosin dan aktivitas proliferasi dengan metode AgNOR.

#### *Pengamatan Histopatologi Sel dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE)*

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan metode pengecatan preparat jaringan *mammae* dengan pewarna Hematoksin Eosin untuk mengetahui keadaan sitologi serta tingkat keparahan kanker yang terjadi. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop binokuler (OLYMPUS® DP12 *Microscope Digital Camera System*) di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta. Analisis histopatologi dilakukan dengan pengamatan secara deskriptif kualitatif.

#### *Pengamatan Proliferasi Sel dengan Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)*

Penentuan aktivitas proliferasi sel diamati dengan menggunakan metode pewarnaan AgNOR. Preparat histologi diimmersikan dalam buffer sodium sitrat (pH 6,0), diinkubasi di dalam *autoclave* pada suhu 120°C (tekanan 1,1-1,2 bar) selama 20 menit, didinginkan sampai suhu 37 °C kemudian diimmersikan ke dalam larutan pengecatan perak yang terdiri dari satu bagian volume gelatin 2% dalam asam formiat 1% dan dua bagian larutan perak nitrat 25% selama 13 menit dalam gelap. *Slide* dimasukkan ke dalam 5 % larutan natrium tiosulfat lalu dibilas dalam air terdestilasi. Kemudian jaringan didehidrasi menggunakan etanolik dengan konsentrasi bertingkat, dicuci dengan *xylylene* dan ditempelkan pada resin atau medium sintesis (12). Analisis aktivitas antiproliferasi dilakukan

dengan perhitungan titik hitam (*black dots*). Pengamatan *black dots* dilakukan dengan mikroskop cahaya (Olympus, Japan) dengan perbesaran 1000 kali dalam minyak imersi. Pada tiap sampel dihitung minimal 100 sel dengan lima lapangan pandang berbeda. Pengecatan dan pengamatan AgNOR dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran UGM.

#### **Analisis Data**

Hasil perhitungan *black dots* dikonversikan ke nilai mAgNOR yaitu rata-rata jumlah *black dots* pada minimal 100 sel. Data pengamatan nilai mAgNOR antar kelompok dianalisis menggunakan ANOVA (SPSS versi 16). Metode statistik yang digunakan adalah statistik parametrik dengan uji *Kolmogorov – Smirnov*. Bila data terdistribusi normal (nilai signifikansi lebih atau mendekati 0.05) dilanjutkan dengan *post-hoc* test uji *Tukey HSD* dengan taraf kepercayaan 95%.

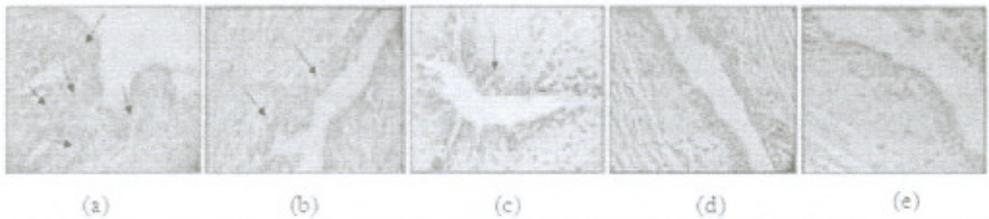
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Hasil**

#### **Pemeriksaan Histopatologi Jaringan *Mammae* pada Sel Kanker Payudara Terinduksi DMBA**

Pada penelitian ini ingin diketahui bagaimana pengaruh pemberian EHC terhadap aktivitas proliferasi sel *mammae* tikus yang dipejani DMBA dengan melihat gambaran histopatologi sel epitel kelenjar payudara tikus. Pengamatan histopatologi sel dilakukan dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Secara mikroskopis gambaran histopatologi sel epitel kelenjar payudara tikus kontrol DMBA menunjukkan terjadinya perubahan yang spesifik akibat induksi DMBA yang bertendensi ke arah terjadinya kanker.

Hasil pengamatan preparat yang dicat dengan HE terlihat adanya perubahan histopatologi pada kelompok dengan perlakuan DMBA (Gambar 1a) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 1d dan 1e). Gambaran preparat HE kelompok DMBA menunjukkan bahwa sel bagian *ductus* menjadi



**Gambar 1. Gambaran histopatologi sel epitel kelenjar payudara tikus dengan pewarnaan HE setelah perlakuan EHC.** Kelompok kontrol DMBA (a), DMBA+EHC 750 mg/KgBB (b), DMBA+EHC 1500 mg/KgBB (c), Kontrol Pelarut CMC-Na (d), Kontrol EHC 1500mg/KgBB (E).

Tampak adanya perbedaan gambaran histologi antar kelompok setelah diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x. EHC mampu memperbaiki histopatologi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA. Tanda panah (→) menunjukkan adanya perubahan morfologi di bagian *ductus* sel epitel payudara tikus menjadi *multilayer* yang mengindikasikan terjadinya karsinogenesis akibat perlakuan DMBA.

*multilayer* yang memperlihatkan adanya indikasi karsinogenesis dan terjadi proliferasi sel akibat pemberian DMBA. Pada kelompok kontrol EHC (Gambar 1d) dan kontrol pelarut CMC-Na (Gambar 1e) sel epitel tampak sebagai *single layer*, yang berarti sel masih normal. Kelompok yang diberi perlakuan EHC dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB tampak bahwa sel mampu memperbaiki histologi akibat perlakuan DMBA (Gambar 1b dan 1c).

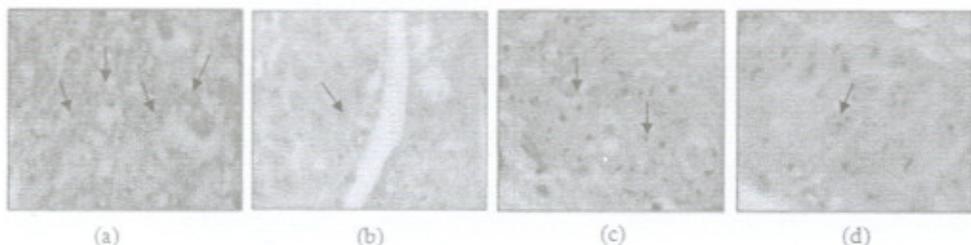
Hasil pengamatan perubahan histopatologi sel epitel kelenjar payudara tikus dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa EHC mampu memperbaiki morfologi sel epitel kelenjar payudara tikus yang diinduksi karsinogenesis. Pengecatan dengan pewarnaan HE belum mampu memberikan informasi apakah perubahan morfologi terjadi karena EHC mampu menghambat proliferasi sel kanker. Oleh karena itu, untuk mengetahui apakah EHC dapat menghambat atau menurunkan proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA perlu dilakukan pengamatan aktivitas antiproliferasi EHC.

#### Aktivitas Antiproliferatif EHC

Metode yang digunakan dalam menentukan aktivitas proliferasi sel kanker adalah *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR) dengan menghitung jumlah

seluruh *black dots* pada minimal 100 sel kemudian di rata-rata dengan cara membagi jumlah seluruh *black dots*. Dengan pewarnaan perak, NOR yang bersifat argirofilik akan tampak sebagai *black dots* yang dapat dikuantifikasikan. Metode ini dapat menunjukkan pembelahan sel dengan mengkuantifikasikan NOR yang mengindikasikan aktivitas proliferasi sel kanker (12).

Pengamatan preparat AgNOR secara visual menunjukkan kelompok bahwa kelompok kontrol DMBA (Gambar 2a) memiliki *black dots* yang lebih banyak dibanding kelompok kontrol tanpa perlakuan DMBA (Gambar 2d). Hal ini menunjukkan terjadi proliferasi sel yang berlebihan pada kelompok kontrol DMBA yang mengarah pada terjadinya karsinogenesis. Secara umum, kelompok perlakuan EHC menunjukkan jumlah *black dots* yang lebih sedikit dibanding kelompok DMBA. Kelompok DMBA+EHC 1500 mg/KgBB (Gambar 2c) memiliki gambaran *black dots* lebih sedikit dibanding kelompok DMBA+EHC 750 mg/KgBB (Gambar 2b). Penurunan jumlah *black dots* menunjukkan penurunan tingkat proliferasi sel, sehingga EHC 1500 mg/KgBB dapat menurunkan proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA ke tingkat normal.

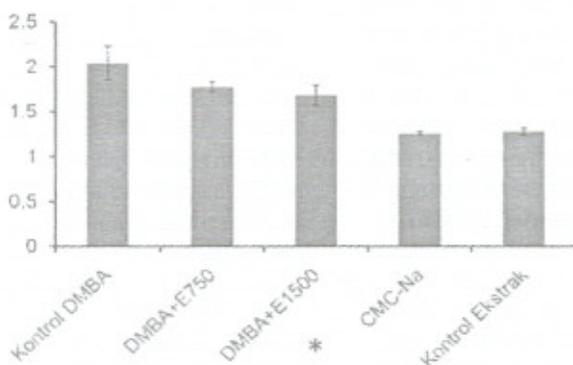


**Gambar 2.** Penghambatan proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA oleh EHC. Pengamatan tingkat proliferasi dilakukan dengan pewarnaan AgNOR. Kelompok kontrol DMBA (a); DMBA+EHC 750 mg/KgBB (b); DMBA+EHC 1500 mg/KgBB (c); Kontrol EHC 1500mg/KgBB (d). Tanda panah (→) menunjukkan adanya *black dots* yang mengindikasikan adanya proliferasi sel. Gambar diambil dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000x.

Hasil kuantifikasi AgNOR menunjukkan bahwa kelompok perlakuan DMBA memiliki nilai mAgNOR paling tinggi yang berarti aktivitas proliferasi sel paling tinggi dibanding kelompok lain (Gambar 3). Nilai mAgNOR paling rendah ditunjukkan oleh kelompok kontrol pelarut. Perlakuan EHC dengan variasi dosis menunjukkan penurunan purata *black dots*. Hal ini berarti EHC memiliki kemampuan menurunkan aktivitas proliferasi sel epitel kelenjar payudara terinduksi DMBA. Skor mAgNOR ( $X \pm SD$ ) untuk kelompok perlakuan DMBA sebesar

$2,04 \pm 0,19$ , kelompok perlakuan DMBA+EHC 750 mg/KgBB  $1,77 \pm 0,05$ , kelompok perlakuan DMBA+EHC 1500 mg/KgBB  $1,68 \pm 0,11$ , kontrol pelarut  $1,26 \pm 0,02$ , dan kelompok kontrol EHC 1500 mg/KgBB sebesar  $1,28 \pm 0,04$ .\*

Secara statistik, hasil kuantifikasi mAgNOR dengan uji Kolmogorof-Smirnov dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil uji *One Way* ANOVA dan uji Tukey menunjukkan nilai mAgNOR antara kelompok DMBA berbeda signifikan dengan kelompok DMBA+EHC 1500



**Gambar 3.** Efek penurunan jumlah *black dots* pada sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA akibat perlakuan EHC yang dinyatakan dalam nilai mAgNOR. Kuantifikasi jumlah *black dots* (nilai mAgNOR) pada tiap kelompok perlakuan untuk melihat tingkat proliferasi yang terjadi dilakukan dengan menghitung 100 sel tiap lapang pandang dengan perbesaran 1000x. Data diambil dari 3x replikasi  $\pm$  standar deviasi (SD), pada taraf kepercayaan 95%. \*) Kelompok DMBA+EHC 1500 mg/kgBB berbeda signifikan dengan kontrol DMBA, yang berarti bahwa EHC 1500 mg/kgBB mampu menurunkan tingkat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA

mg/KgBB yang berarti perlakuan EHC menurunkan tingkat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA. Nilai mAgNOR kelompok DMBA+EHC 1500 mg/KgBB tidak berbeda signifikan dengan nilai mAgNOR kelompok kontrol tanpa perlakuan, artinya perlakuan EHC 1500mg/KgBB mampu mengembalikan tingkat proliferasi sel yang telah mengalami inisiasi karsinogen ke tingkat proliferasi sel normal. Berdasarkan hasil penelitian, EHC mampu menurunkan proliferasi sel epitel kelenjar payudara.

### Pembahasan

Hasil uji *in vivo* pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan (EHC) mampu menghambat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus galur Sprague Dawley yang terinduksi DMBA. Pada penelitian ini efek antiproliferasi oleh perlakuan EHC dosis 1500 mg/kgBB lebih baik dibandingkan perlakuan dosis 750 mg/kgBB. Sehingga dapat dikatakan bahwa dengan semakin meningkatnya dosis maka efek antiproliferasi semakin tinggi.

Pada penelitian ini, mekanisme antiproliferasi EHC ditunjukkan dengan kemampuannya dalam mengembalikan morfologi sel epitel kelenjar payudara tikus yang terinduksi kanker ke tingkat normal, serta menurunkan jumlah *black dots* dan nilai mAgNOR pada tikus yang terinduksi kanker. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EHC sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada kanker payudara karena memiliki aktivitas penghambatan proliferasi sel.

Mekanisme penghambatan proliferasi sel yang ditunjukkan EHC kemungkinan dikarenakan EHC memiliki kemampuan untuk menghambat siklus sel, maupun melalui *cell cycle arrest* yang dapat pula memicu terjadinya apoptosis. Menurut Hsieh *et al.* (6) ciplukan dapat meregulasi proliferasi sel melalui induksi G2/M *arrest* melalui mekanisme inhibisi sintesis mRNA, menurunkan ekspresi protein p21 dan p27, serta meningkatkan ekspresi protein Chk2. Selain itu, EHC juga kemungkinan mampu

menghambat proliferasi sel dengan menginduksi apoptosis melalui regulasi protein terkait apoptosis seperti p53 (7). Penelitian yang dilakukan oleh Darma *et al.* (13) menunjukkan bahwa EHC mampu meningkatkan ekspresi protein p53 pada sel kanker leher rahim HeLa. Peningkatan ekspresi p53 dapat menyebabkan terjadi peningkatan ekspresi p21 (*downstream* dari p53). Ekspresi protein p21 inilah yang diasumsikan menjadi penyebab proliferasi sel kanker berhenti pada pada fase G2/M (*growth arrest*). Namun, hal tersebut masih perlu dibuktikan lebih lanjut untuk melihat pengaruh EHC pada siklus sel dan ekspresi protein p21 untuk membuktikan pengaruh ekspresi p53 terhadap penghambatan proliferasi sel melalui G2/M *arrest*.

Kemungkinan mekanisme molekuler tersebut mampu menjelaskan mekanisme aktivitas antiproliferasi EHC sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemoprevensi kanker payudara. Akan tetapi, hasil yang ditunjukkan oleh penelitian ini belum menggambarkan dosis efektif yang dapat digunakan dalam terapi kanker payudara. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut baik untuk uji toksisitas, optimasi dosis dan waktu perlakuan, maupun uji *in vivo* menggunakan ekstrak terpurifikasi sehingga dapat diperoleh hasil yang lebih baik dalam penentuan dosis efektif sebelum memasuki uji klinik. Perlu juga dilakukan penelitian lanjutan terkait dengan pembuatan sediaan yang siap dikonsumsi. Keberhasilan penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan suatu alternatif pengobatan yang lebih murah dengan memanfaatkan tumbuhan liar di sekitar kita, bahkan di masa mendatang dapat menjadi fitofarmaka yang potensial dalam menunjang pengobatan kanker payudara.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan mampu mempengaruhi histopatologi dan menurunkan proliferasi sel epitel payudara tikus betina galur Sprague Dawley yang terinduksi 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene

(DMBA) sehingga berpotensi untuk dijadikan agen kemoprevensi kanker payudara.

#### DAFTAR PUSTAKA

- (1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, and Pisani P. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2008; 55:74-108.
- (2) Albar ZA, Tjindarbumi D, Ramli M, Lukitto P, Reksoprawito S, and Handojo D. *cit* Histopaedianto I, Choridah L, and Aryandono T. Validity of BI-RADS System Mammography to Detect Breast Cancer at Dr. Sardjito Hospital Yogyakarta. *Berkala Ilmu Kedokteran.* 2008; 40(1):20-25.
- (3) Cardenas LI, Mace D, Richardson RA, Wilson F, Shan S, and Dewhurst MW. The Pervasive Presence of Fluctuating Oxygenation in Tumors. *Cancer Res.* 2008; 68:5812.
- (4) Fitria M. Uji Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) pada Sel Kanker Payudara MCF-7. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2010.
- (5) Armandari I, Palupi KD, and Farida S.. Kombinasi Sinergis Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata*) dengan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara T47D. *Program Kreativitas Mahasiswa Artikel Ilmiah;* 2009.
- (6) Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, and Chung JG. *Physalis angulata* Induced G2/M Phase Arrest in Human Breast Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44:974-983.
- (7) Wu S, Ng L, Lin D, Huang S, Wang S, and Lin C. *Physalis Peruviana* Extract Induces Apoptosis in Human Hep G2 Cells through CD95/CD95L System and the Mitochondrial Signaling Transduction Pathway. *Cancer Letters.* 2004; 215:199-208.
- (8) Leong OK, Muhammad TST, and Sulaiman SF. Cytotoxic Activities of *Physalis minima* L. Chloroform Extract on Human Lung Adenocarcinoma NCI-H23 Cell Lines by Induction of Apoptosis. *eCAM Advance Access.* 2009; 1-10.
- (9) Hemerson I, Maria L, Marcia R, Paula A, Deusdenia O, Edilberto R, Veras L, Manoel O, and Claudia P. In-vitro and In-vivo Antitumour Activity of Physalins B and D from *Physalis angulata* L. Pharmaceutical Press. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2006; 58:235-241.
- (10) Magalhães HI, Veras ML, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Silveira ER, Costa-Lotufo LV, de Moraes MO, and Pessoa C. In-vitro and in-vivo antitumour activity of Physalins B and D from *Physalis angulata*. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58(2):235-241.
- (11) Chiang HC, Jaw SM, and Chen PM. Inhibitory Effect of Physalin B and Physalin F on Various Human Leukimia Cells in Vitro. *Anticancer Research.* 1992; 12(4):1155-62.
- (12) Derenzini M, Trer'e D, Marie-Francoise O'Donohue and Ploton D. Interphase nucleolar organiser regions in tumour pathology *cit* Crocker J and Murray PJ. *Molecular Biology in Cancer Pathology.* Birmingham UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003.
- (13) Darma AP, Ashari RA, Nugroho PA, Fauzi IA, and Monikawati A. Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) pada Sel Kanker Leher Rahim HeLa Melalui Regulasi Ekspresi Protein p53 dan Bcl-2. *Program Kreativitas Mahasiswa Artikel Ilmiah;* 2010.