

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

Maya Fitria, Inna Armandari, Dita Brenna Septhea, Adam Hermawan, Muthi Ikawati
dan Edy Meiyanto

Cancer Chemoprevention Reserach Center
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>

*Corresponding autor email : meiyan_e@ugm.ac.id

ABSTRAK

Kanker payudara menduduki peringkat kedua kanker yang meyerang wanita Indonesia dan penggunaan kemoterapi dalam pengobatannya menimbulkan efek samping yang merugikan serta resistensi. Hal ini yang mendorong peneliti untuk mengembangkan alternatif pengobatan dengan bahan alam yang diharapkan memberikan efek samping kecil namun tetap memiliki efek terapi yang baik. Ciplukan telah terbukti memiliki efek sitotoksik dan mampu memacu apoptosis pada beberapa sel kanker seperti sel kanker Hep G2, Hep 3B, PLC/PRF/5 dan MDA-MB 231. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak etanolik herba ciplukan pada sel kanker payudara MCF-7 serta pengaruhnya pada pemacuan apoptosis.

Ekstrak etanolik herba ciplukan (EEC) diuji efek sitotoksiknya pada sel MCF-7 menggunakan metode MTT untuk memperoleh IC₅₀. Selain itu dilakukan juga pengecatan DNA dengan akridin oranye-etidium bromida (double staining) untuk mengamati terjadinya apoptosis. Dari hasil penelitian, diperoleh IC₅₀ sebesar 187 µg/mL yang menunjukkan EEC poten sebagai agen sitotoksik. Hal ini didukung oleh hasil double staining yang menunjukkan sel mengalami apoptosis. Dari penelitian ini dapat disimpulkan ekstrak etanolik herba ciplukan memiliki efek sitotoksik dan memacu apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.

Kata Kunci : *Herba ciplukan (*Physalis angulata L.*), sel MCF-7, sitotoksik, apoptosis.*

ABSTRACT

Breast cancer is the second rank of cancer desease which attacks Indonesian women and the use of chemotherapy in its therapy gives negative effect and resistant. This fact encourages researcher to develop alternative therapy using natural compounds which has minimal side effects but has good efficacy. Ciplukan showed citotoxic effect and induces apoptotis on several cancer cells such as Hep G2, Hep 3B, PLC/PRF/5 and MDA-MB 231 cells. This research has objective to inquire cytotoxic

effect of ciplukan herb ethanolic extract (EC) on MCF-7 breast cancer cell and its effect in apoptosis induction.

Ciplukan herb ethanolic extract is tested its cytotoxic effect on MCF-7 cancer cells using MTT assay to get IC_{50} . In addition, double staining also done using acrydin orange-etidium bromide to observe the apoptosis. This research shows that ciplukan herb ethanolic extract has 187 ug/ml of IC_{50} that shows that EC is potential as cytotoxic agent. This result is supported by result in double staining that shows cells has apoptotic effect. From this research can be concluded that EC has a cytotoxic effect and induces apoptosis on MCF-7 breast cancer cell.

Keyword : *Ciplukan herb ethanolic extract, MCF-7 cells, cytotoxic, apoptosis.*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker karsinoma yang menyerang pada jaringan epitelial payudara. Lebih dari 20 tahun, insidensi kanker payudara di United State mengalami peningkatan dari 25.000 menjadi 44.000 kasus tiap tahun (1). 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 (2). 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 (3). 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 (4). Flavonoid dapat menurunkan enzim xantin oksidase, siklooksigenase (COX), dan lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam pro-oksidasi sehingga akan menunda siklus sel (5). Selain senyawa-senyawa tersebut, ciplukan juga mengandung fisalin yang merupakan senyawa aktif dalam menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker (6).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menguji aktivitas dari herba ciplukan ini. Penelitian Wu *et al.* (7) menunjukkan bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan mempunyai aktivitas antihepatoma pada sel hepatoma manusia Hep G2, Hep 3B dan PLC/PRF/5. Magalhães *et al.*, (8) 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 (6).

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 difagositosis (*engulfed*) (9). Penelitian yang dilakukan oleh Heish *et al.*, (10), membuktikan bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB 231. Penelitian-penelitian ini menunjukkan bahwa ciplukan mempunyai aktivitas sitotoksik dan mampu menginduksi apoptosis pada beberapa sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak etanolik herba ciplukan juga mempunyai aktivitas sitotoksik serta mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.

METODE PENELITIAN

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 dipisahkan 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 Gadjah Mada yang ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco).

Uji Sitotoksitas

Sel MCF-7 yang telah konfluen dipanen 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 absorbansi 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 μ L media kultur. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO₂ (Heraeus) agar sel teradaptasi kembali. Selanjutnya sel diberi perlakuan IC₅₀ ekstrak dan kontrol sel. Pada akhir inkubasi, media kultur DMEM (*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 μ L. 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 kesalahan 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. Dari hasil determinasi, didapatkan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar ciplukan (*Physalis angulata* L.).

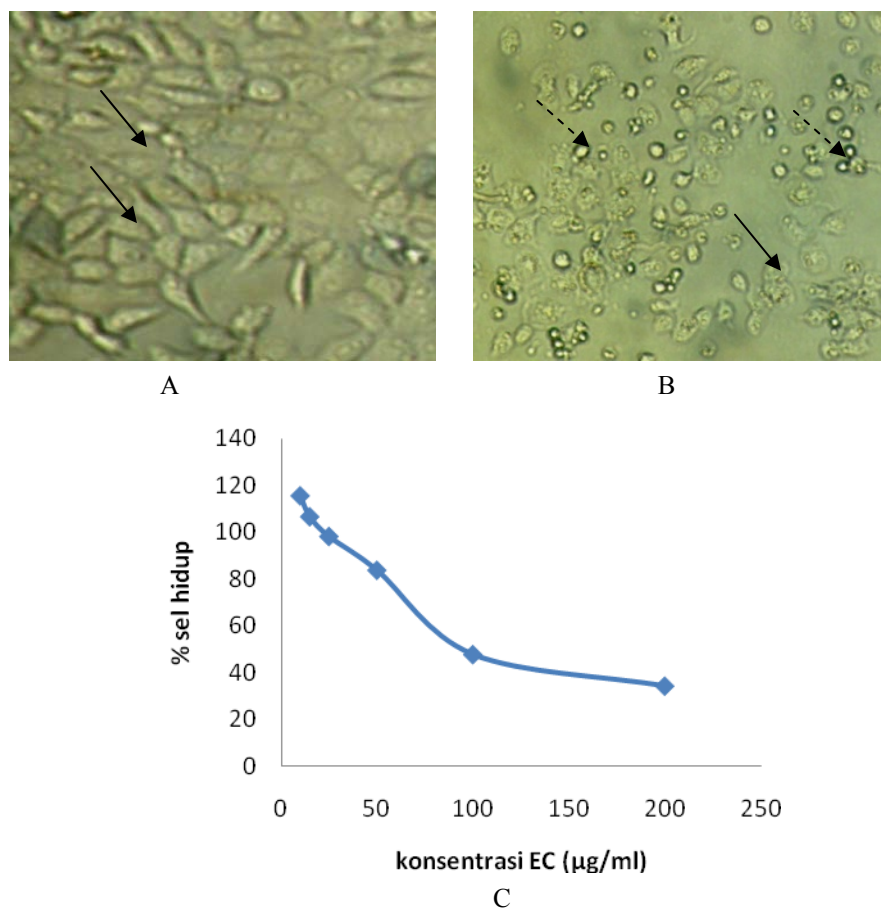
Efek Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (EC) pada Sel Kanker Payudara MCF-7

Ciplukan merupakan salah satu bahan alam yang mempunyai banyak komponen aktif diantaranya saponin, flavonoid, polyphenol, dan physalin (3). 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 λ 595 nm. Intensitas warna yang terbaca akan sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Selanjutnya absorbansi dikonversikan ke menjadi % sel hidup dengan rumus :

$$\% \text{Hidup} = \frac{\text{Absorbansi Sel Dengan Perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media}}{\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi Kontrol Media}} \times 100\%$$

Dari % sel hidup ini lalu dilakukan perhitungan IC_{50} . IC_{50} ini 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 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar I. 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

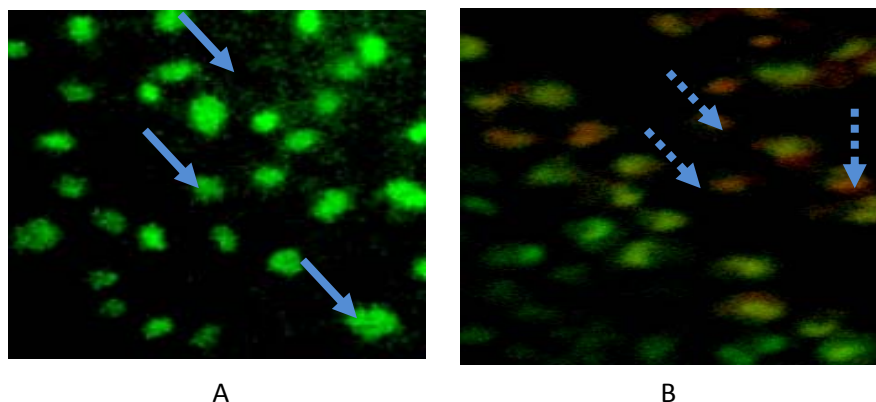


perbesaran 100x. Kontrol sel (A). Perlakuan EC dengan kadar 100 $\mu\text{g/ml}$ (B). Grafik hubungan % sel hidup versus konsentrasi EC (C). Setiap titiknya menunjukkan rata-rata dari tiga replikasi. Sel hidup (), sel mati ().

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 I A), sedangkan sel yang telah mengalami kematian tampak berbentuk bulat dan mengapung (Gambar I B). Pemberian EC juga menunjukkan fenomena *dose dependent* dimana % sel hidup terus berkurang seiring bertambahnya dosis (Gambar I 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 118 $\mu\text{g/ml}$, maka EC berpotensi untuk dijadikan salah satu alternatif dalam pengobatan kanker payudara.

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



Gambar II. Efek perlakuan EC pada sel kanker payudara MCF-7 dengan menggunakan metode *double staining*. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10^4 sel MCF7 selama 24 jam. Pengecatan dilakukan dengan menggunakan Akridin orange-Etidium bromid dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 10×10 . Kontrol sel (A). Sel yang mengalami apoptosis setelah diberi perlakuan EC dengan kadar (B). Sel hidup berfluoresensi hijau (—▶) sedangkan sel yang mati berfluoresensi orange (···▶).

Kelompok perlakuan menggunakan EC menunjukkan adanya aktivitas apoptosis (Gambar II B), sedangkan pada kelompok kontrol tidak terlihat adanya aktivitas

apoptosis (Gambar II A). Adanya aktivitas apoptosis pada kelompok perlakuan ini disebabkan karena sel mengalami kerusakan membrane akibat pemberian EC sehingga etidium bromid yang digunakan untuk mewarnai sel dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan floresensi orange. Sedangkan pada kelompok kontrol sel, membrane 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.

Pembahasan

Dari hasil penelitian diketahui bahwa IC_{50} EC pada sel kanker payudara MCF-7 sebesar 118 $\mu\text{g}/\text{mg}$. 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 $\mu\text{g}/\text{mg}$), EC belum memberikan efek yang berarti yang ditunjukkan dengan % sel hidup masih di atas 80%. Perubahan morfologi sel mulai tampak pada konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dimana pada konsentrasi ini mulai banyak sel yang mengalami kematian dengan morfologi sel bentuk bulat dan mengapung, dan pada konsentrasi yang lebih besar lagi (100 dan 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$), jumlah sel yang mengalami kematian semakin banyak. Dari sini dapat ditarik kesimpulan bahwa EC cukup poten 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 (11). 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 (12) sehingga kemungkinan mekanisme pemacuan apoptosis oleh EC yang terjadi pada sel MCF-7 mirip dengan mekanisme yang terjadi pada sel Hep G₂. Di lain 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 (13,14). Fisalin yang merupakan senyawa aktif dalam EC juga

merupakan senyawa steroid (15) 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 κ B dari *downstream* P13K/Akt (16). 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* (17), 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 di permukaan 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 molekuler 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 (2,18). 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.

KESIMPULAN

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.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Muthi' Ikawati, M.Sc, Apt selaku dosen pembimbing dan *Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC)* Farmasi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dowsett M: Introduction to Sessions on 'Predicting personal risk for breastcancer. *Breast Cancer Research* 2008, 10, London, UK.
2. Tyagi AK, Agarwal C, Chan DCF, and Agarwal R: 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* 2004, 11:493-499.
3. Shingu K: Three New Withanolides, Physagulins E, F and G from *Physalis angulata* L. *Chem Pharm Bull* 1992, 40, 2448-2451.
4. Raju and Rao: Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graecum* (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* 2004, 13: 1392.
5. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, and Zhang L: Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med Res Rev* 2003, 23(4): 519-534.
6. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM: Inhibitory Effect of Fisalin B and Fisalin F on Various Human Leukimia Cells in vitro. *Anticancer Res* 1992, 12(4): 1155-62
7. [Wu](#), [Ng](#), [Chen](#), [Lin](#), [Wang](#), [Lin](#): Antihepatoma Activity of *Physalis Angulata* and *P. Peruviana* Extracts and Their Effects on Apoptosis in Human Hep G2 Cells. *Life Sci* 2004, 74(16):2061-73.
8. Magalhães, Hemerson IF, Veras, Maria L, Torres, Márcia R, Alves, Ana PNN, Pessoa, Otilia DP, Silveira, Ediberto R, Costa-Lotufo, Leticia V, de Moraes, Manoel O, Pessoa, Cláudia: In-vitro and In-vivo Antitumor Activity of Fisalin B and D from *Physalis angulata*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58th Ed 2006, 235-241(7)..
9. Ricci MS, and Zong, WX: Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist* 2006, 11:342–357. *Mol. Med.*, 110, 173-183.
10. Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, Chung JG: *Physalis Angulata* Induced G2/M Phase Arrest in Human Breast Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol* 2006., 44:974—983.
11. Wu S, L. Ng, D.Lin, S.Huang, S.Wang, C.Lin :Extract Induces Apoptosis in Human Hep G2 Cells through CD95/CD95L system and the Mitochondrial Signaling Transduction Pathway. *Cancer Letters* 2009, 215(2):199-208.
12. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, and Fornace AJ: An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 2000., 60:6101–6110.
13. Ardelean A, George-Ciprian PRIBAC: Diosgenin, the Active Principle of *Trigonella* sp. Extract may Induce Apoptosis on MCF-7 Cancer Cells through Caspase Activation. ANUL IV, NR 2008, 3 (14).

14. Sowmyalakshmi S, Ranga R, C Gary G, and Damodaran C: *Effect of Diosgenin (Fenugreek) on Breast Cancer Cells*. Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46, 2005.
15. Kawai M, Yamamoto T, Makino B, Yamamura H, Araki S, Butsukan G, and Saito K: The Structure of Physalin T from *Physalis Alkekengi* var. *franchetti*. *J Asian Nat Prod Res* 2001,3(3):199-205.
16. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, and Beckman B: *Apoptosis, Chemoresistance, dan Breast Cancer: Insights from The MCF7 Cell Model System*. *Exp Biol Me* 2003, **228**:995–1003.
17. Liang, Y, Yan C, and Schor NF: Apoptosis in The Absence of Caspase 3. *Oncogene* 2001, **20**: 6570–6578
18. Davis MA: *Apoptosis Methods in Pharmacology and Toxicology : Approaches to Measurement and Quantification*. Humana Press Inc 2002, New Jersey.