

Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap Sel T47D secara *In Vitro*

IRA DJAJANEGARA*, PRIYO WAHYUDI

P3Teknologi Bioindustri Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT)
Gedung II BPPT Lantai 13, Jln. M.H. Thamrin 8, Jakarta Pusat.

Diterima, 10 September 2008, Disetujui 3 Maret 2010

Abstract: Cutleaf groundcherry (*Physalis angulata* Linn.) is a popular traditional medicine. This experiment was conducted to investigate the possible role of the herbal extract as an anticancer agent using T47D breast cancer cell line. Cytotoxicity assay was carried out by direct counting method. Breast cancer T47D cell lines were treated with 70% ethanol extract from cutleaf groundcherry fruit with serial dilution of 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, and 31.25 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hours of incubation at 37°C. As a positive control doxorubicin was also tested on the breast cancer T47D cell lines with serial dilution of 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, and 0.156 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hours of incubation at 37°C. The amount of living cells were observed and counted, death percentage was then determined and probit analysis was used to determine the LC_{50} value. The LC_{50} value for ethanol extract from the fruits was 28,02 $\mu\text{g/ml}$ while doxorubicin as the positive control was 0,113 $\mu\text{g/ml}$. It is concluded that the cutleaf groundcherry (*Physalis angulata*) fruits have a cytotoxic activity toward T47D (breast cancer) cell lines which confirmed previous toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method.

Keywords: fruit, cutleaf groundcherry (*Physalis angulata*), citotoxicity, T47D (breast cancer) cell lines.

PENDAHULUAN

KANKER adalah penyakit yang terjadi karena pembelahan sel yang tidak terkontrol dan tidak terbatas. Jumlah penderita kanker semakin meningkat dari tahun ke tahun. Jenis penyakit kanker yang banyak terdapat pada masyarakat saat ini adalah kanker payudara, hati, limfoma, darah, dan kanker mulut rahim. Pada 1992 diketahui bahwa perempuan penderita kanker payudara di Amerika telah mencapai 182.000 orang, dan lebih dari 20% penderitanya pada stadium 4 meninggal setiap tahun. Sementara itu, di Indonesia kematian akibat kanker mencapai 4,3% pada 1986^(1,2).

Pengobatan kanker secara medis memerlukan biaya yang sangat tinggi. Selain melalui bedah dan radiasi, pengobatan kanker mengandalkan kemoterapi. Kemoterapi menggunakan obat-obat antikanker masih banyak terkendala masalah, di antaranya masih belum efektifnya obat dalam membunuh sel kanker dan efek samping yang harus diderita oleh pasien. Selain pengobatan konvensional tersebut, masyarakat juga

banyak mencoba kemungkinan penyembuhan dengan pengobatan alternatif menggunakan ramuan bahan alami (*natural medicine*).

Di dalam ilmu pengetahuan, khususnya fitofarmaka, dikatakan bahwa obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan galenik (ekstrak) atau campuran dari bahan-bahan tersebut yang secara turun-temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengobatan atau obat tradisional. Obat tradisional adalah sediaan yang diolah dari simplisia, sediaan galenik, atau campuran kedua bahan tersebut yang digunakan dalam bidang kesehatan secara rasional empirik⁽⁵⁾. Karena itu, bagi Indonesia yang dikenal paling kaya dalam keanekaragaman hayati, tanaman obat merupakan salah satu kekayaan alam yang dapat dikembangkan potensinya menjadi obat alami untuk penanganan penyakit kanker⁽³⁾.

Akhir-akhir ini banyak tanaman obat yang diteliti khasiatnya sebagai zat antikanker. Salah satu tanaman yang banyak diteliti adalah herba ceplukan (Gambar 1). Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain saponin, flavonoida, polifenol, asam klorogenat, alkaloid, vitamin C, gula, tanin, asam sitrun, dan fisalin^(3,4). Menurut data empiris, tanaman ini dapat

* Penulis korespondensi, Hp. Hp. 08158845256
e-mail: idjajanegara@yahoo.com

Tabel 1. Data susut pengeringan herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.).

No.	Nama data	Hasil
1.	Herba ceplukan (segar)	5 kg
2.	Herba ceplukan (kering)	3,75 kg
3.	Serbuk herba ceplukan (setelah digiling)	1,3 kg
4.	Ekstrak herba ceplukan (basah)	189,5 g
5.	Ekstrak herba ceplukan (kering)	85,5 g

Tabel 2. Data penapisan fitokimia herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.).

No.	Uji metabolit sekunder	Hasil
1.	Alkaloid	+
2.	Flavonoid	+
3.	Saponin	+
4.	Terpenoid/steroid	+
5.	Tanin	-

Tabel 3. Data uji sitotoksitas dengan Doxorubicin.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Log konsentrasi	Probit	%Viabilitas	%Kematian
20	1,301	-	-	100
10	1	-	-	100
5	0,699	-	-	100
2,5	0,398	6,5301	6,40	93,6
1,25	0,097	6,1077	13,45	86,55
0,625	-0,204	4,9021	53,93	46,07
0,3125	-0,506	4,5573	67,15	32,85
0,156	-0,806	4,4612	70,54	29,46

yang dibagi menjadi 7 seri konsentrasi, yaitu 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25 $\mu\text{g/ml}$, diperoleh persentase kematian tertinggi 100% pada konsentrasi 2000, 1000, dan 500 $\mu\text{g/ml}$. Persentase kematian terendah, 38,65%, ditemukan pada konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai LC_{50} ekstrak etanol 70% herba ceplukan sebesar 28,02 $\mu\text{g/ml}$. Pada perlakuan konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ (Gambar 2a) terlihat sel lebih banyak yang mati dibandingkan pada perlakuan konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (Gambar 2b). Sel yang hidup tampak lonjong, seperti daun menempel di dasar sumuran. Sementara itu, sel yang mati berubah bentuknya menjadi bulat, tampak keruh.

Determinasi merupakan langkah awal dalam penelitian untuk mendapatkan identitas yang benar dari tanaman yang akan diteliti, sehingga dapat memberikan kepastian tentang kebenaran tanaman tersebut. Hal ini dimaksudkan agar tidak terjadi kesalahan terhadap tanaman yang akan digunakan.

Berdasarkan hasil determinasi tanaman dapat diperoleh kepastian bahwa tanaman yang akan digunakan sebagai bahan utama dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn). Ekstraksi herba ceplukan dilakukan dengan cara maserasi karena maserasi merupakan cara yang paling mudah dan sederhana serta untuk bahan yang tidak tahan pemanasan atau zat aktif tersebut belum diketahui tahan panas atau tidak. Sementara itu, herba ceplukan mengandung flavonoid yang berpotensi sebagai antikanker. Senyawa flavonoid yang bersifat polimetil dan polimetoksi larut dalam senyawa polar dan, karenanya, digunakan cairan penyari etanol 70% yang bersifat polar, sesuai dengan pernyataan *like dissolve like*, yaitu zat akan cenderung larut pada zat yang sama tingkat kepolarannya.

Metode perhitungan sel yang digunakan adalah metode *direct counting*. Hasil perhitungan sel dengan metode *direct counting* ini dapat digunakan



Gambar 1. Herba ceplukan (*Physalis angulata*).

digunakan sebagai obat kencing manis, sakit paru-paru, ayatan, borok, dan obat kanker^(3,4).

Data empiris ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya tentang uji toksisitas beberapa tumbuhan obat di Indonesia, termasuk buah herba ceplukan, menggunakan uji kematian larva udang (*Artemia salina* Leach) yang dikenal luas dengan nama metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dari hasil uji tersebut terlihat bahwa ekstrak etanol 70% dari buah herba ceplukan (*Physalis angulata*) menunjukkan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) sebesar 39,63 $\mu\text{g/ml}$ ⁽⁷⁾.

Ekstrak etanol 70% dari buah herba ceplukan dikatakan toksik karena mempunyai nilai $LC_{50} < 1000$ $\mu\text{g/ml}$ ⁽⁴⁾. Hasil uji pendahuluan ini mengindikasikan bahwa ekstrak alkohol buah herba ceplukan juga akan bersifat toksik jika diujikan pada sel kanker sehingga berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai zat antikanker. Secara khusus, hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu mengatasi masalah penyakit kanker yang menempati urutan teratas yaitu kanker payudara. Berdasarkan pertimbangan tersebut, digunakan salah satu jenis sel kanker payudara, yaitu T47D, untuk diujikan pada penelitian ini.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Simplisia yang digunakan adalah herba ceplukan (*Physalis angulata*) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) Bogor dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense. Beberapa bahan kimia yang digunakan untuk mengidentifikasi golongan kimia dalam herbal (uji kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, dan terpenoid), antara lain asam klorida (HCl), larutan Bouchardat, Dragendorff dan Mayer, natrium klorida, besi klorida, gelatin-HCl,

petroleum benzen P, serbuk magnesium, pereaksi Lieberman Bouchard, etanol 96%, timbal asetat, kloroform P, isopropanol P, asam sulfat, dan asam asetat anhidrat. Bahan-bahan lain adalah media-media kultur RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640, tripsin, media kultur Migg, PBS (*phosphate buffered saline*), Fungison (Gibco), Penisilin streptomisin (Gibco), FBS (*fetal bovine serum*) (Gibco), MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2-il) difenil tetra zolium bromida), HCl 1 N teknis, air suling, natrium bikarbonat teknis, HEPES (*N-2-hidroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid*) teknis, SDS (*sodium duodecyl sulphate*), eter teknis, DMSO (dimetil sulfoksida), dan 0,25 % doxorubicin sebagai kontrol positif karena merupakan salah satu obat antikanker golongan kompleks platinum. Sel uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sel T47D yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada.

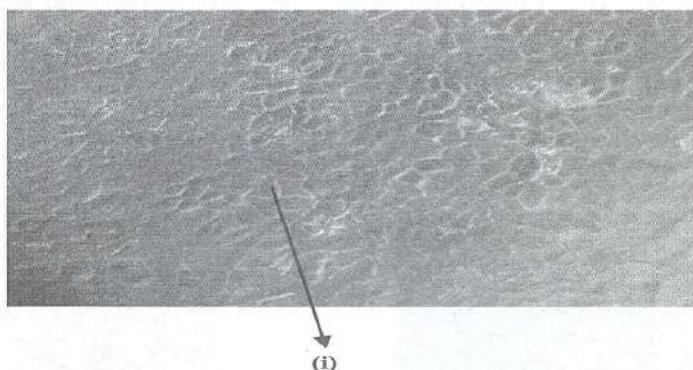
METODE. **Persiapan dan penghitungan ekstrak.** Penelitian dimulai dengan mengidentifikasi golongan kimia dari buah herba ceplukan (*Physalis angulata*)⁽¹²⁾. Hal ini dilakukan untuk memastikan adanya kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, dan terpenoid dalam simplisia yang akan dipakai pada penelitian ini. Langkah selanjutnya adalah mengekstraksi bahan aktif dari buah herba ceplukan dengan etanol 70%. Ekstraksi dengan etanol 70% dilakukan secara maserasi, yaitu serbuk simplisia sebanyak 1 kg direndam dalam toples kaca yang bermulut lebar dengan penambahan 1 liter etanol 70% sampai merendam serbuk simplisia dan dibiarkan selama 3 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian simplisia disaring dengan kertas saring. Perendaman simplisia dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat dari perendaman dengan etanol 70% dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada tekanan rendah dan suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak etanol pekat, dan disimpan pada suhu ruang⁽⁵⁾.

Untuk mengetahui kadar zat yang menguap dalam ekstrak, perlu dilakukan penetapan susut pengeringan terhadap ekstrak dengan tahapan sebagai berikut: pengerjaan dilakukan dengan cara menimbang botol timbang yang bertutup kaca terlebih dahulu, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 30 menit hingga diperoleh bobot tetap. Botol ditimbang, ditara, dan dimasukkan ekstrak sebanyak ± 1 gram ke dalam botol. Botol timbang yang telah terisi dengan ekstrak dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam hingga diperoleh bobot tetap.

Persiapan uji sitotoksitas. Pembuatan larutan uji ekstrak etanol 70% buah herba ceplukan dilakukan dengan mengambil masing-masing ekstrak

Tabel 4. Data uji sitotoksitas dengan ekstrak etanol 70% buah herba ceplukan.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Log konsentrasi	Probit	% Viabilitas	% Kematian
2000	3,301	-	-	100
1000	3	-	-	100
500	2,699	-	-	100
250	2,398	5,7083	24,03	75,97
125	2,097	5,3345	36,91	63,09
62,5	1,796	5	50	50
31,25	1,495	4,7155	61,35	38,65



Gambar 1. Morfologi kontrol sel kanker payudara T47D di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. (i) Sel hidup.



(a)



(b)

Gambar 2. Morfologi sel kanker payudara T47D di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dalam sumuran dengan perlakuan ekstrak etanol 70 % herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) dengan kadar 62,5 $\mu\text{g/ml}$ (a) dan kadar 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (b). (i) Sel hidup, (ii) Sel mati.

karena memberikan hasil yang lebih baik dari pada metode MTT. Metode *direct counting* ini dilakukan di bawah mikroskop menggunakan hemositometer.

Pada pengujian sitotoksitas setelah proses inkubasi, media dalam sumuran disedot kemudian

ditambahkan tripsin EDTA 0,25% untuk mempermudah lepasnya sel kanker payudara T47D dari sumuran dengan cara memotong protein membran yang berfungsi untuk melekatkan sel dengan sumuran. Dari setiap sumuran diresuspensi untuk melepaskan

sebanyak 200 mg disuspensikan ke dalam 1 ml RPMI 1640. Kemudian suspensi ekstrak etanol 70 % herba ceplukan dibuat seri kadar, dan suspensi dalam berbagai kadar tersebut dapat diujikan pada subjek uji atau disimpan dalam lemari es untuk penelitian selanjutnya. Dari larutan induk tersebut dibuat pengenceran dengan konsentrasi 2000, 1000, 500, 250; 125; 62,5; dan 31,25 µg/ml. Untuk Doxorubicin, yang digunakan sebagai kontrol positif, dibuat larutan dengan konsentrasi 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; dan 0,156 µg/ml dari larutan induk yang berkonsentrasi 20 µg/ml.

Uji sitotoksitas dengan metode penghitungan langsung. Pembuatan media RPMI 1640, larutan *phosphate saline buffer* (PBS), larutan tripsin dan larutan biru tripan dilakukan sesuai metode yang dikembangkan oleh Doyle & Griffith⁽¹¹⁾. Pengaktifan, pembiakan, dan pengembangan sel T47D dilakukan sesuai metode yang dipakai oleh Doyle & Griffith⁽¹¹⁾. Adapun kepadatan sel T47D dihitung menggunakan hemositometer dengan mencampurkan 20 µl suspensi sel dan 180 µl media yang mengandung biru tripan (konsentrasi stok 0,4%) pada perbesaran 100 x. Penghitungan sel dilakukan pada empat bilik hitung yang masing-masing terdiri dari 16 kotak dan diambil rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (volumenya 10-4 ml). Jumlah sel dihitung dengan rumus:

$$(n / 4) \times P \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

- n = jumlah sel dalam 4 bilik
 4 = jumlah bilik hemositometer yang dihitung
 10⁴ = kapasitas hemositometer per 1 ml
 P = faktor pengenceran

Uji sitotoksitas dengan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dilakukan dengan membagi lima kelompok pengujian, yaitu media ditambah sel sebagai kontrol negatif, sel ditambah pelarut (DMSO) sebagai kontrol pelarut, dan sel ditambah doxorubicin sebagai kontrol positif. Masing-masing konsentrasi yang telah disebutkan di atas dimasukkan ke dalam plat 96 sumuran sebanyak 100 µl dan ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 µl. Seri kadar diulang tiga kali (triplo) agar valid. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Untuk menghitung jumlah sel yang hidup (berwarna kuning) maupun mati (berwarna biru), diambil 20 µl dan direaksikan dengan tripan biru sebanyak 180 µl selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi dan diambil 10 µl untuk dihitung jumlah selnya. Persentase kematian sel dengan metode penghitungan langsung

(*viable cell count*) dilakukan menggunakan rumus yang dipakai oleh Doyle & Griffith⁽¹¹⁾, yaitu:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{Jumlah sel yang hidup} \times 100\%}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{mati}}$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas}$$

Persentase kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit menggunakan tabel probit. Selanjutnya, dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antara perlakuan dan kematian sel T47D. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian disubstitusi dan di-antilogaritma untuk mendapatkan nilai LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Herbarium Bogorensie menunjukkan bahwa simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ceplukan (*Physalis angulata*) yang termasuk dalam keluarga Solanaceae. Data serbuk dan ekstrak disajikan pada Tabel 1. Hasil yang diperoleh dari susut pengeringan ekstrak etanol 70% herba ceplukan adalah 55%. Hasil penapisan fitokimia sampel ceplukan disajikan pada Tabel 2. Sampel berwarna coklat, dan berbau tajam. Dari hasil pemeriksaan dengan pereaksi kimia, diketahui bahwa sampel herba ceplukan mengandung alkaloid, flavanoid, saponin, dan terpenoid.

Kepadatan sel yang dihitung dengan hemositometer adalah sebanyak 173 sel dengan rata-rata 43,25 sel pada tiap bidang. Dengan demikian, diperoleh kepadatan sel 4,325x10⁶ sel/ml. Untuk pengujian sitotoksitas, kepadatan sel yang dibutuhkan adalah 4x10⁴ sel/ml saja.

Hasil uji sitotoksitas doxorubicin terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode penghitungan langsung disajikan pada Tabel 3. Larutan doxorubicin dibagi menjadi 8 seri konsentrasi, yaitu 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; dan 0,156 µg/ml. Pada penelitian ini diperoleh persentase kematian sel tertinggi oleh doxorubicin adalah pada konsentrasi 20; 10; dan 5 µg/ml sebesar 100%. Persentase kematian sel terendah 29,46% pada konsentrasi 0,156 µg/ml dan nilai LC₅₀ doxorubicin 0,113 µg/ml.

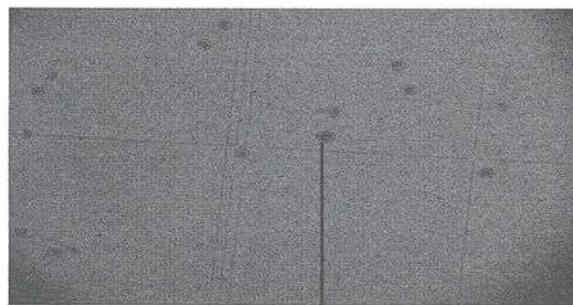
Hasil uji sitotoksitas ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode penghitungan langsung disajikan pada Tabel 4. Pada larutan uji ekstrak etanol 70% herba ceplukan

sel dari sumuran dan untuk menghomogenkan sel, sehingga sel dapat terdistribusi merata di dalam sumuran. Sel kanker payudara T47D yang hidup akan melekat pada sumuran, sedangkan sel yang mati sebagian besar melayang dalam media sehingga ikut tersedot bersama media. Dengan demikian, semua sel akan terpapar secara merata terhadap bahan aktif yang diuji.

Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup pada uji sitotoksitas ini dilakukan berdasarkan parameter kerusakan membran yang dilakukan menggunakan biru tripan (Gambar 3). Jika sel kanker payudara T47D mati, maka akan terjadi kerusakan membran sehingga protein di dalam sel akan keluar dan akan berikatan dengan biru tripan sehingga sel yang mati akan tampak biru (Gambar 3n). Sementara itu, untuk sel yang hidup, karena membran plasmanya masih utuh maka protein dalam sel tidak akan berikatan (*up take*) dengan biru tripan sehingga sel tampak terang bersinar (Gambar 3m)⁽¹¹⁾.



(m)



(n)

Gambar 3. Pemaparan biru tripan, sel yang hidup (m) dan sel yang mati (n).

Uji sitotoksitas ekstrak etanol 70% herba ceplukan ini dilakukan untuk mengetahui potensi toksisitasnya terhadap sel kanker payudara T47D. Parameter yang digunakan dalam uji sitotoksitas ini adalah LC_{50} yang merupakan manifestasi toksisitas. LC_{50} merupakan konsentrasi ekstrak etanol 70% yang mampu mematikan sel sebesar 50% populasi⁽⁷⁾. Bila nilai $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$, zat tersebut bersifat sitotoksik atau berpotensi sebagai antikanker⁽⁷⁾. Analisis LC_{50} dilakukan dengan analisis probit⁽¹⁾.

Dari hasil perhitungan LC_{50} dapat dilihat bahwa nilai LC_{50} doxorubicin jauh lebih kecil dibandingkan nilai LC_{50} ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.). Doxorubicin memiliki aktivitas sitotoksitas terhadap sel kanker payudara T47D yang lebih besar dibandingkan

aktivitas sitotoksitas ekstrak etanol 70% herba ceplukan. Hal ini terjadi karena doxorubicin merupakan senyawa tunggal yang berfungsi sebagai antikanker, sementara ekstrak etanol 70% herba ceplukan masih terdiri dari berbagai senyawa yang khasiatnya belum diketahui.

Salah satu kandungan kimia dari ekstrak etanol 70% herba ceplukan adalah flavonoid yang diberitakan berfungsi sebagai antikanker^(3,5). Adapun beberapa mekanisme kerja dari flavonoid dalam melawan kanker adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis, pembalikan resistensi multi-obat, atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut^(8,9). Sementara itu, doxorubicin mempengaruhi sintesis DNA maupun RNA, antara lain memutuskan untai tunggal dan untai ganda DNA, yang mungkin diakibatkan oleh adanya pembentukan radikal bebas. Aktivitas klinis dan peranannya dibatasi oleh kardiotoxikitasnya⁽¹⁰⁾.

SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai $LC_{50} = 28,02 \mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ma'at S. Tanaman obat untuk pengobatan kanker. *Jurnal Bahan alam Indonesia*. 2003.2(1):188.
2. Kirpal D. In vitro and in vivo growth suppression of MCF-7 human breast cancer by novel photoproducts and tamoxifen. *Int J of the Am Cancer Soc*. 1994. 74(6):23-45.
3. Djumidi. Inventaris tanaman obat Indonesia. Jilid I. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI; 1991. hal. 179-80.

4. Reksoprodjo S. Kumpulan kuliah ilmu bedah. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Bagian ilmu bedah Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia / Rumah Sakit Dr. Cipto Mangun Kusumo; 1995. hal. 342-63, 225-32.
5. Dirjen POM Depkes RI. *Materia medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Dirjen POM Depkes RI; 1995. hal. 195-9.
6. Meiyanto E. Kurkumin sebagai antikanker: menelusuri mekanisme aksinya. *Majalah Farmasi Indonesia*. 1999.10(4):224-36.
7. Hudgson EP. *Textbook of Modern Toxicology*. 2nd ed. Singapore: The McGraw-hill Companies, Inc.; 2000. p. 172-7.
8. Schafer JM, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, Jordan VC. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clin Cancer Res*. 2000.6:4373-80.
9. Subroto A, Saputro. Gempur penyakit dengan sarang semut. Diambil dari <http://www.deherba.com/p6.htm>. Diakses tanggal 4 November 2007.
10. Karwati I. Uji toksisitas ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan, fraksi etanol, dan fraksi air terhadap herba ceplukan (*Physalis agulata* Linn.) [skripsi]. Jakarta: Fakultas MIPA UHAMKA; 2006. hal. 35.
11. Doyle A, Griffiths JB. *Cell and tissue culture for medical research*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.; 2000. p. 12-6, 48-9, 409.
12. Harborne. *Metode fitokimia*. Terbitan kedua. Terjemahan dari: *Phytochemical methods*. Oleh: Padmawinata, Kosasih, Iwan S. Bandung: Penerbit ITB; hal. 6, 147.
13. *Radiat Phys Chem*. 1995.46:161-8.
14. Khoylou F, Naimian F. Radiation synthesis of superabsorbent polyethylene oxide/tragacanth hydrogel. *Radiation Physic and Chemistry*. 2009, (78):195-198.
15. Badan Standarisasi Nasional. SNI 16-6363-2000: Pembalut wanita. Jakarta. 2000.
16. Soerens, Dave A, Malik S. PATENT 6967261 (USA).
17. Sanju F, Manmohan K, Lalit V. Radiation synthesis of superabsorbent poly(acrylic acid)-carrageenan hydrogels. *Radiation Physic and Chemistry*. 2004. (69):481-6.
18. Tomar RS, Indu G, Reena S, Nagpal AK. Synthesis of poly(acrylamide-co-acrylic acid)-based superabsorbent hydrogels by gamma radiation: study of swelling behaviour and network parameters. *Designed Monomers and Polymers*. 2007.10(1):49-66.