

**PENINGKATAN EKSPRESI p53 OLEH EKSTRAK ETANOLIK RUMPUT MUTIARA
(*Hedyotis corymbosa*) PADA SEL HEPAR TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* TERINDUKSI
7,12-DIMETILBENZ[a]ANTRASENA**

**INCREASING OF p53 EXPRESSION BY ETHANOLIC EXTRACT OF
Hedyotis corymbosa ON *SPRAGUE DAWLEY* RAT LIVER CELLS, INDUCED BY
7,12-DIMETILBENZ[a]ANTRASENA**

**Dyani Primasari Sukamdi¹, Aditya Asyhar¹, Rifki Febriansah¹, Rosana Anna Ashari¹,
Riris Istighfari Jenie¹, dan Edy Meiyanto^{1,2*}**

¹Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Cancer Chemoprevention Research Center

meiyan_e@ugm.ac.id

ABSTRAK

Asam ursolat dan asam oleanolat yang terdapat dalam Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa*) diduga dapat menghambat kanker dengan berbagai mekanisme. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanolik rumput mutiara sebagai agen pemacu apoptosis melalui uji *in vivo* menggunakan tikus galur Sprague Dawley terinduksi 7,12-dimetilbenz[a]antrasena (DMBA). Kelompok hewan uji yang digunakan terdiri dari kontrol ekstrak 1500mg/kgBB, kontrol pelarut CMC-Na, kontrol DMBA, perlakuan DMBA+ekstrak dosis 750mg/kgBB dan perlakuan DMBA+ekstrak 1500mg/kgBB. Hasil percobaan selanjutnya dianalisis menggunakan metode TUNEL (TUNEL assay) dan Imunohistokimia terhadap ekspresi protein p53 untuk mengetahui tingkat pemacuan apoptosis dari sel kanker hepar hewan uji. Hasil analisa menggunakan metode TUNEL menunjukkan hasil bahwa hepar tikus mengalami apoptosis relatif tinggi pada kelompok perlakuan DMBA+ekstrak. Hasil pengamatan menggunakan metode Imunohistokimia diketahui bahwa sel kanker hepar mengalami pemacuan ekspresi protein p53 yang menunjukkan terjadinya apoptosis pada sel hepar tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak rumput mutiara dapat memacu apoptosis dan dapat digunakan sebagai salah satu alternatif pengobatan penyakit kanker.

Kata Kunci: *H.corymbosa*, DMBA, apoptosis, p53, TUNEL

ABSTRACT

Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) has a potential as anticancer. This plant contains ursolate acid and oleanolate acid may prevent cancer with several mechanisms. This research was aimed to study the ethanolic extract of rumput mutiara as apoptosis inducing agent *in vivo*. This study was conducted in Sprague Dawley rats induced by 7,12-Dimethylbenz[a]Antracene (DMBA). The data was analysed using TUNEL assay and immunohistochemistry method for the expression of p53 protein. The results showed that the ethanolic extract of rumput mutiara increased the p53 protein expression, indicated that the extract can induce apoptosis and can be used as an alternative for anticancer medication.

Key Word : *H.corymbosa*, DMBA, apoptosis, p53, TUNEL

PENDAHULUAN

Jumlah kematian di dunia karena kanker terutama kanker hepar menunjukkan insidensi yang sangat tinggi. Pada tahun 2002 jumlah kematian akibat kanker hepar di dunia mencapai 598.000 jiwa (Parkin *et al.*, 2005). Untuk itu diperlukan pencegahan terhadap penyakit kanker sedini mungkin mengingat akan bahaya kematian yang ditimbulkannya. Pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif untuk penyakit kanker sangat penting untuk diusahakan. Beberapa peneliti melaporkan bahwa bahan dari tanaman mempunyai potensi sebagai regulator negatif

onkogen dan regulator positif gen *suppressor*, sehingga berpotensi sebagai agen antikanker (Gibbs, 2000).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*). Kandungan dari tanaman ini diantaranya adalah asam oleanolat, asam ursolat, hentriacotane, stigmasterol, β -sitosterol, γ -sitosterol, sitisterol-D-glucosida, asam *p*-kumarat, dan glikosida flavonoid (Khashtgir *et al.*, 1960). Kandungan aktif dari tanaman rumput mutiara yang diduga berfungsi sebagai senyawa antikanker adalah asam ursolat dan asam oleanolat. Menurut Sukamdi

et al. (2008) ekstrak etanolik rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) mampu menghambat proliferasi sel dan mampu menekan ekspresi C-Myc (Febriansah *et al.*, 2008) pada sel hepar tikus terinduksi 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasena (DMBA). Selain itu diketahui bahwa salah satu senyawa aktif dalam rumput mutiara, yaitu asam oleanolat mampu menginduksi apoptosis pada sel tumor K562 (Liu *et al.*, 2004). Namun belum diketahui kemampuan ekstrak etanolik rumput mutiara dalam menginduksi apoptosis pada sel hepar yang terinduksi DMBA.

Penelitian mengenai agen antikanker dengan mekanisme spesifik pada apoptosis sel penting karena pada umumnya sel kanker tidak mempunyai kemampuan melakukan apoptosis. Proses apoptosis sel dipengaruhi oleh beberapa protein. Protein p53 merupakan contoh protein yang mempengaruhi apoptosis sel. Protein p53 berperan dalam mengatur adanya tekanan respon sel pada mamalia melalui aktivasi transkripsi gen yang meliputi kontrol siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis (Amudson *et al.*, 1998). Peningkatan ekspresi p53 akan memacu terjadinya apoptosis melalui 2 mekanisme, yaitu dengan peningkatan protein Bax dan penurunan ekspresi protein Bcl-2 (King, 2000). Protein Bax akan berikatan dengan mitokondria dan menginduksi pelepasan sitokrom C (Nuñez *et al.*, 1998). Pelepasan sitokrom C ini akan mengaktifasi salah satu *caspase* dalam jalur *caspase*, yaitu *caspase-9*, yang selanjutnya akan mengaktifasi *caspase* lain yang bertindak sebagai *downstream caspase* seperti *caspase-7* (Schafer, 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak etanolik rumput mutiara dapat memacu apoptosis sel melalui pemacuan ekspresi protein p53 pada sel hepar tikus yang telah diinduksi dengan DMBA. Hasil dari uji *in vivo* ini dapat digunakan sebagai dasar untuk mengetahui selektivitas senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut sebagai agen kemopreventif, khususnya melalui pemacuan apoptosis dari sel kankernya.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2008. Tempat penelitian adalah di laboratorium *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas Farmasi UGM dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM.

Bahan Tanaman dan Preparasi Ekstrak

Rumput mutiara didapatkan di daerah Sleman sebanyak 8,22 kg dan telah dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM.

Selanjutnya dikeringkan, dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender (*Maspion*) dan diayak dengan ayakan B40. Lalu serbuk dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Fraksi etanol yang didapatkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Hewan Uji

Tikus betina galur *Sprague Dawley* umur 40 hari dengan berat badan seragam (70-120 gram) sebanyak 30 ekor, diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM yang kemudian dipelihara dalam kandang plastik dengan alas sekam. Hewan uji dalam kandang diletakkan dalam ruangan dengan suhu kamar (23-25°C) dan diberi makan pelet.

Bahan Kimia

Etanol 96% (Merck, Darmstadt), CMC-Na 0,5% sebagai pelarut ekstrak, 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasena atau DMBA (Sigma Chem. CO, St. Louis, MO) untuk induksi kanker, *corn oil* sebagai pelarut DMBA, *aquadest* (Asia Lab), *formaldehyde* (Sigma Chem. CO, St. Louis, MO) sebagai larutan fiksasi organ, reagen *Tunel Assay* (Formalin 4 %, gelatin, seloidin, parafin, resin, *xylene*, anti fluoresensi, PBS, *antibody*, *Tunel kit*) sebagai pewarna pengecatan histopatologi, NaCl 0,9%.

Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus. Sebelum digunakan tikus diadaptasi pada kandang percobaan selama satu minggu dan hanya diberikan makan pelet dan minum air ledeng. **Kelompok I** sebagai kelompok perlakuan DMBA diberikan larutan DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB dalam *corn oil* pada minggu pertama secara per oral, frekuensi pemberian 10 kali pemberian selama 5 minggu. **Kelompok II** sebagai kelompok perlakuan ekstrak, diberikan ekstrak etanolik rumput mutiara dosis 1500 mg/kgBB dalam pelarut CMC-Na 0,5% secara peroral setiap hari selama 10 hari. **Kelompok III** dan **IV** sebagai kelompok perlakuan DMBA+dosis, mulai diberi DMBA pada minggu pertama dengan dosis 20 mg/kgBB secara per oral, frekuensi pemberian 10 kali selama 5 minggu. Setelah pemejanaan DMBA, tikus tidak diberi perlakuan selama 4 minggu. Kemudian diberi perlakuan ekstrak yang disuspensikan dalam CMC-Na 0,5% setiap hari selama 10 hari. Kelompok III diberi dosis ekstrak 750 mg/kgBB. Kelompok IV dosis 1500 mg/kgBB. Setelah pemejanaan ekstrak terakhir dilakukan nekropsi pada minggu ke-9. **Kelompok V** sebagai kelompok perlakuan pelarut CMC-Na 0,5%

Pada minggu keempat sampai kedelapan

tidak dilakukan perlakuan, hanya diberi makan pelet dan minum air. Awal minggu ke-9 dilakukan pengorbanan hewan uji dengan dislokasi leher dan dilakukan nekropsi. Organ hepar diisolasi dan diawetkan dengan *buffer* formalin untuk analisis induksi apoptosis. Analisis induksi apoptosis dilakukan dengan TUNEL Assay dan Imunohistokimia (IHC).

Pengamatan Induksi Apoptosis dengan *TdT-mediated X-dUTP nick end labeling* (TUNEL Assay)

Deteksi adanya apoptosis dilakukan dengan menempatkan potongan setebal 3-4 μm dan diletakkan di atas *slide* polyisin kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45⁰C. Setelah itu merehidrasi preparat organ dengan aquades steril, kemudian ditambah dengan 50 μl TUNEL *label mix* (campuran 5 μl *enzyme solution* dan 45 μl *labeling solution*) dengan TdT. Preparat ditutup dengan *siliconized cover slip*. Preparat diinkubasi pada suhu 37^o C selama 30 menit di dalam *moist chamber*. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan *RNase solution* pada suhu 37^o C selama 30 menit. Kemudian preparat dicuci lagi dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan larutan Propidium iodida pada suhu ruang selama 10 menit. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat ditutup dengan *cover slide* diameter 18 mm dan *immumount*. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluoresen. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi warna hijau sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi merah.

Pemeriksaan Ekspresi p53 dengan Imunohistokimia (IHC)

Blok parafin yang telah berisi jaringan dipotong setebal 3-4 μm dan diletakkan di atas *slide* polyisin kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45⁰ C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan xilen sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Dilanjutkan dengan pencucian dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida (H₂O₂ dalam metanol) selama 20 menit, lalu dicuci dengan aquades dilanjutkan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan melakukan perendaman preparat dalam bufer sitrat pH 6,0 di dalam *microwave*. Lalu dibiarkan dingin selama 20-30 menit lanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak 3 kali masing-masing

selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dalam *normal mouse serum* selama 5 menit. Selanjutnya *normal mouse serum* dibersihkan (tanpa cuci), preparat ditetesi dengan antibodi primer antibodi monoklonal anti p53 selama 60 menit atau semalam dalam lemari es (8^oC). Dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dengan antibodi sekunder terbiotinilasi selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan *streptavidin-peroksidase* selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air kran selama 10-15 menit, selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan hematoxylin selama 3-4 menit. Preparat dicuci dengan air kran 10-15 menit. Dilanjutkan rehidrasi secara bertingkat dengan etanol absolut, etanol 95%, etanol 80% dan xylol sebanyak 2 kali. Terakhir dilakukan *mounting* sebelum ditutup dengan *deck glass*. Pengecatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

Selanjutnya dilakukan pengamatan ekspresi p53 pada sel hepar pada semua kelompok hewan uji. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Sel yang mengekspresikan protein p53 akan tampak berwarna coklat pada sitoplasma sel, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan memberikan warna ungu pada membran sel. Pengamatan ekspresi p53 dinyatakan secara kualitatif dengan membandingkan antara kelompok perlakuan. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop binokuler (Olympus[®] DP12 *microscope digital camera system*) di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Analisis Data

Metode TUNEL assay digunakan untuk mengetahui informasi adanya apoptosis sel hepar secara kualitatif dengan mikroskop fluoresens. Preparat IHC digunakan untuk mengamati ekspresi p53 pada sitoplasma sel hepar tikus secara kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

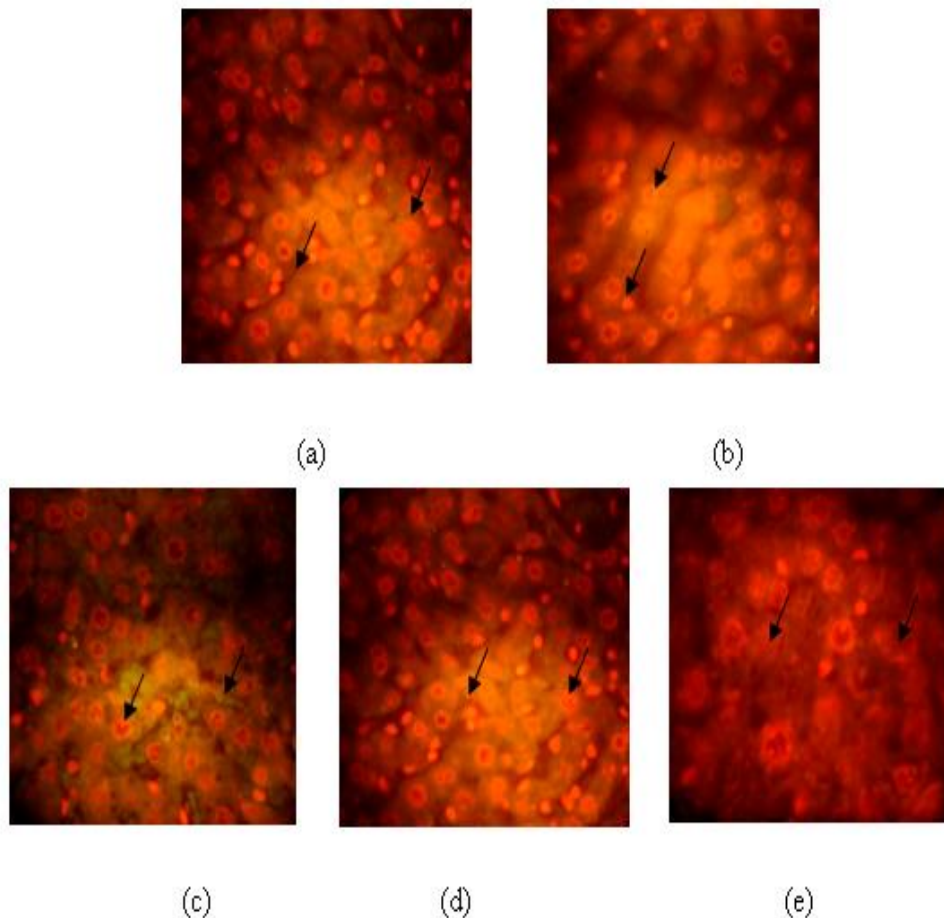
Hasil

Pengamatan TUNEL assay

TUNEL Assay merupakan metode untuk mengamati efek pemberian ekstrak rumput mutiara terhadap sel yang mengalami apoptosis (kematian sel) dengan menggunakan label secara enzimatis. DNA yang mengalami pematahan akan terlabeli dengan *DNA polymerase* (*Nick Translation*) dan *Terminal*

Deoxynukleotidyl Transferase nick end labeling (Wyllie *et al.*, 2000). Ujung 3'OH dari DNA yang mengalami fragmentasi akan dikenali oleh enzim terminal *deoxynukleotidyl transferase* dan dilabeli dengan fluorescein-dUTP sehingga

dapat diamati dengan mikroskop fluoresensi (Wyllie *et al.*, 2000). Deteksi sel yang mengalami apoptosis dengan TUNEL menggunakan alat mikroskop fluoresensi.



Gambar 1– Pengamatan apoptosis menggunakan metode TUNEL assay. Kontrol CMC-Na (a). Kontrol DMBA (b). Ekstrak dosis 1500 mg/kg BB (c). Perlakuan DMBA+Ekstrak dosis 750 mg/kg BB (d). Perlakuan DMBA+Ekstrak dosis 1500 mg/kg BB (e). Pada preparat dari berbagai perlakuan tidak menunjukkan apoptosis (perbesaran 1000x lensa obyektif). Keterangan : —▶ sel berfluoresensi merah (belum menunjukkan apoptosis)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada seluruh kelompok perlakuan hewan uji, terlihat sel berfluoresensi merah (bukan berfluoresensi hijau). Hasil menunjukkan ekstrak etanolik rumput mutiara dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB tidak berpengaruh terhadap terjadinya apoptosis pada sel hepar yang terinduksi DMBA (Gambar 1).

Pengamatan Ekspresi p53 dengan Imunohistokimia

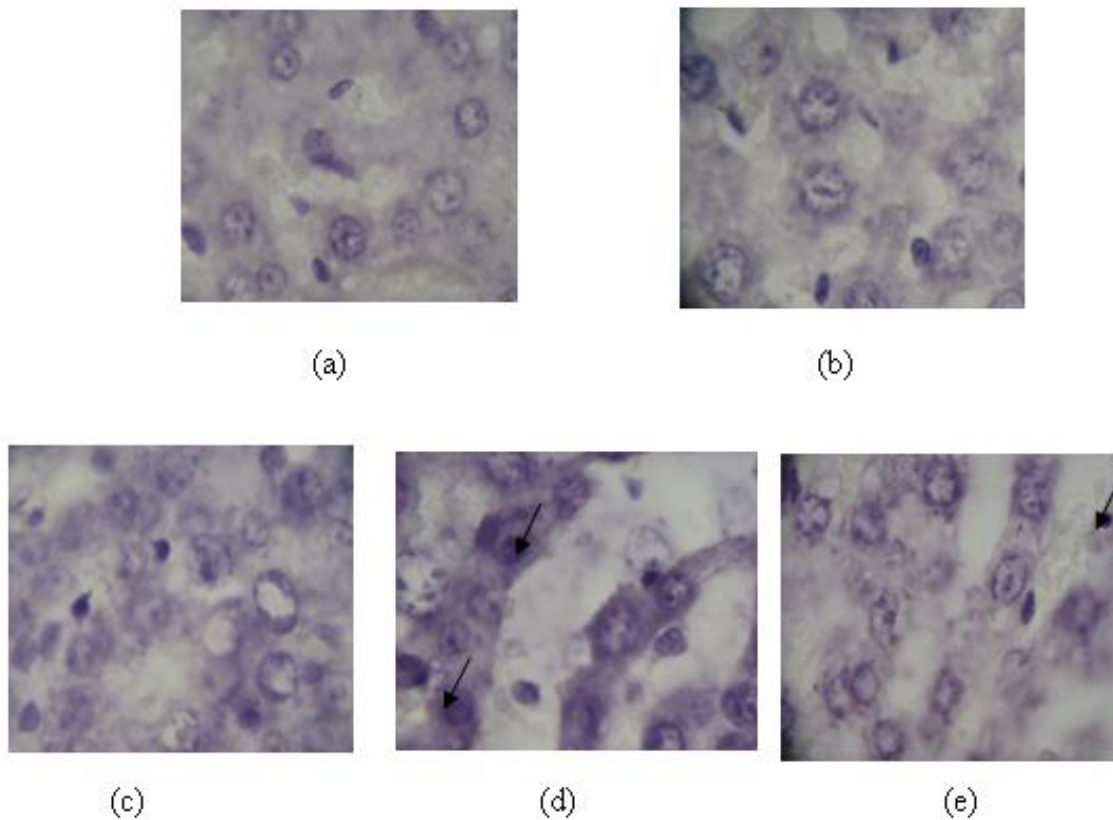
Imunohistokimia merupakan metode yang biasa digunakan untuk menentukan adanya antigen dalam suatu jaringan yang telah dilabel dengan antibodi, interaksi antigen-antibodi dapat diamati melalui fluoresensi, enzim dan elemen radioaktif. Interaksi antigen-antibodi yang dihasilkan dari metode

imunohistokimia adalah spesifik sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi ekspresi protein. Dalam identifikasi ekspresi protein p53, digunakan antibodi monoklonal yang secara spesifik dapat mengenali p53.

Hasil pengamatan imunohistokimia menunjukkan bahwa kelompok kontrol CMC-Na (Gambar 2a) dan kontrol DMBA (Gambar 1b) tidak menunjukkan ekspresi p53. Begitu juga halnya dengan kontrol ekstrak 1500 mg/kgBB yang tidak menunjukkan ekspresi p53. Sel berwarna coklat menandakan bahwa p53 yang diekspresikan adalah p53 *wild type*. Pada perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB menunjukkan adanya warna coklat pada sel hepar, namun intensitas warnanya lebih rendah dibandingkan dengan pada sel hepar kelompok perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB. Hal ini menandakan bahwa pada kelompok perlakuan

DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB ekspresi p53 lebih rendah daripada pada kelompok perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB, artinya

dosis 750 mg/kgBB mampu meningkatkan ekspresi p53 lebih efektif dari dosis 1500 mg/kgBB.



Gambar 2—Pengamatan ekspresi p53 menggunakan metode IHC Kontrol CMC-Na (a). Kontrol DMBA (b). Ekstrak dosis 1500 mg/kg BB (c). Perlakuan DMBA+Ekstrak dosis 750 mg/kg BB (d). Perlakuan DMBA+Ekstrak dosis 1500 mg/kg BB (e). Pada preparat DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB menunjukkan ekspresi p53 lebih intensif daripada preparat yang lain (perbesaran 1000x lensa obyektif). Keterangan : —> Ekspresi p53

PEMBAHASAN

Manfaat rumput mutiara dalam pengobatan kanker perlu dikembangkan. Data-data yang diperoleh melalui penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik rumput mutiara memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui mekanisme pemacu apoptosis sel kanker tikus yang terinduksi DMBA. Senyawa yang berperan sebagai agen antikanker adalah asam ursolat dan asam oleanolat (Pheng *et al.*, 1997).

Menurut Liu *et al.* (2004), senyawa aktif dalam rumput mutiara yaitu asam oleanolat mampu menginduksi apoptosis sel tumor K562. Penelitian ini menunjukkan pemberian ekstrak etanolik rumput mutiara pada hewan uji selama 7 hari belum mampu menginduksi apoptosis. Peristiwa apoptosis sering dikaitkan dengan protein p53, yaitu protein yang akan terekspresi ketika terjadi kesalahan pada siklus sel. Protein p53 akan menginduksi terjadinya *cell cycle arrest*. Protein p53 akan menginduksi peningkatan level p21. Respon tersebut

bertujuan memberikan waktu untuk reparasi atas kerusakan DNA yang terjadi. Namun, jika kesalahan yang terjadi tidak mampu diperbaiki, ekspresi p53 meningkat sehingga akan menginduksi terjadinya kematian sel atau proses apoptosis (Hanahan *and* Weinberg, 2000). Pengecatan ekspresi p53 menggunakan antibodi anti-p53 yang mengenali p53 mutan non-denaturasi di nukleus atau p53 *wild type* terdenaturasi di sitoplasma. Warna coklat pada sitoplasma sel menunjukkan p53 yang diekspresikan adalah p53 *wild type* di sitoplasma yang mempunyai peran pada regulasi siklus sel ataupun apoptosis (Matlashewsky, 1999).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak etanolik rumput mutiara selama 7 hari pada hewan uji, menyebabkan peningkatan ekspresi p53 pada sel hepar tikus terinduksi DMBA. Akan tetapi pada perlakuan ini belum memperlihatkan adanya kejadian apoptosis sel. Hal ini bisa disebabkan karena waktu pemberian dosis

kurang lama dan dosis yang digunakan kurang tinggi. Penelitian terdahulu menunjukkan ekstrak telah mampu menghambat proliferasi sel (Sukamdi *et al.*, 2008; Febriansah *et al.*, 2008). Ekspresi p53 dalam percobaan ini dimungkinkan berkaitan dengan proses penghambatan proliferasi sel. Ekstrak ini dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanolik rumput mutiara belum memperlihatkan apoptosis sel namun dapat meningkatkan ekspresi p53.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada DP2M DIKTI melalui PKM 2008 dan GKI UGM 2008 atas biaya yang diberikan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Amudson, S.A., Myers, T.G., and Fornace Jr, A.J., 1998., Roles for p53 in Growth Arrest and Apoptosis: Putting On The Brakes After Genotoxic Stress, *Oncogene*, **17**, 3287–3299

Febriansah, R., Asyhar, A., and Ashari, R.A., 2008, Ekstrak Etanolik Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa*) Berefek Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetil Benz[*a*]Antrasena melalui Penghambatan Ekspresi Protein C-MYC, *Prosiding Kongres Ilmiah XVI ISFI 2008*, ISBN: 978-979-95107-6-2. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia

Gibbs, JB., 2000, Anticancer Drug Targets: Growth Factor and Growth Factor Signaling, *J. Clin. Inves.*, 105 (1): 9–13

Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, **100**, 57–70

Khastgir, H.N., Sengupta, S.K., and Sengupta, P., 1960, Note on The Constituents of The Indian Medicinal Plant *Oldenlandia corymbosa* Linn, *Journal of The American Pharmaceutical Association*, **49**, 562–563

King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd Ed., Pearson Education Limited, London

Liu, H., Sanlong, W., Bin Cai, and Xinsheng, Y., 2004, Anticancer Activity of Compounds Isolated from *Engelhardtia serrata* Stem Bark, *Pharmaceutical Biology*, **42**: 475–477

Matlashewsky, G. 1999. p53: Twenty years on, Meeting Review, *Oncogene*, **18**:7618-7620

Nuñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N., 1998, Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene*, **17**:3237–3245

Parkin D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P., 2005, Global Cancer Statistics 2002, *CA Cancer J Clin.*, **55**, 74–108

Peng, J.N., Feng, X.Z., Li G.Y., and Liang, X.T., 1997, Chemical investigation of genus *Hedyotis*. II. Isolation and identification of iridoids from *Hedyotis chrysotricha*, *Yao Xue Xue Bao*, **32**:908–913

Schafer., K.A. 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.*, **35**: 461-478.

Sukamdi, D.P., Stefani, and Palupi, K.P., 2008, Potensi Antiproliferasi Ekstrak Etanolik *Hedyotis corymbosa* (L) Lamk terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12-Dimetil Benz[*a*]Antrasena, *Prosiding Kongres Ilmiah XVI ISFI 2008*, ISBN: 978-979-95107-6-2, Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia

Wyllie, A.H., 2000, *Cell Death, Apoptosis, and Cell Proliferation*, Roche Diagnostic Corporation, German