

## **Chloroform fraction of ethanolic extract of *Elephantopus scaber* Linn. increase the p53 expression on human breast cancer (T47D) cell line**

### **Fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn.) meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker payudara T47D**

**Nurkhasanah, Nanik Sulistyani\*, Lukman Mahdi**

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan*

*Jl. Prof. Dr. Soepomo, S.H., Yogyakarta*

*Submitted: 30 -05-2017*

*Reviewed: 11-07-2017*

*Accepted: 18-09-2017*

#### **ABSTRAK**

Tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Tumbuhan ini mengandung senyawa seskuioterpen lakton yang memiliki aktivitas antiproliferatif pada sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman terhadap ekspresi p53 pada sel T47D. Ekstrak etanol diperoleh dengan cara maserasi dengan etanol 96 %. Ekstrak difraksinasi dengan petroleum eter kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan petroleum ether dan kloroform berturut-turut, sehingga diperoleh fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman. Pengamatan ekspresi p53 dilakukan menggunakan metode imunositokimia menggunakan antibodi antip 53. Sel T47D yang telah dikultur diberi perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman dengan konsentrasi 7,06 µg/mL dan 3,53 µg/mL. Ekspresi protein p53 ditandai dengan timbulnya warna coklat pada inti sel. Hasil uji imunositokimia setelah pemberian perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol sebesar 7,06 µg/mL pada sel kanker payudara T47D menunjukkan morfologi sel yang mengalami proses apoptosis tahap akhir yang mengarah ke nekrosis. Sementara itu, perlakuan 3,53 µg/mL fraksi kloroform ekstrak etanol menyebabkan peningkatan ekspresi p53.

**Kata kunci:** *Elephantopus scaber*, fraksi kloroform, sel T47D, ekspresi p53

#### **ABSTRACT**

*Elephantopus scaber* Linn had been used as traditional medicine. It contain some lacton sesquiterpene with antiproliferative activity. The study aim was to explore the effect of chloroform fraction of ethanolic extract of *E. scaber* on the expression of p53 on T47D cell line. The ethanol extract was found by maceration method. The extract was then fractionated using petroleum ether and chloroform respectively to get the chloroform fraction. The expression of p53 was observed by immunocytochemistry method with antip53 antibody. The p53 cell line was cultured and treated with fraction with concentration of 7.06 and 3.53 µg/mL. The expression of p53 was showed by brown colour in the nucleus of the cell.

---

**Penulis korespondensi:**

Nanik Sulistyani

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

Jl. Prof. Dr. Soepomo, S.H., Yogyakarta

Email: nanik.sulistyani@gmail.com

The result showed that chloroform fraction treatment with concentration of 7.06 µg/mL induced apoptotic cell death in the end stage (necrosis). While the treatment with lower concentration 3.53 µg/mL could increase the p53 expression.

**Keywords:** *Elephantopus scaber*, chloroform fraction, T47D cell line, p53 expression

## PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan masalah kesehatan utama yang menjadi penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskular. Penyakit kanker payudara di Indonesia menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks dengan prevalensi kanker payudara sebesar 0,5% pada tahun 2013. Prevalensi kanker payudara tertinggi terdapat pada Provinsi D.I. Yogyakarta yaitu sebesar 2,4%. Estimasi jumlah penderita kanker payudara terbanyak terdapat di provinsi Jawa Tengah (Kemenkes RI, 2015).

Tapak liman merupakan tanaman suku *Asteraceae* yang berbentuk gulma. Tanaman ini mengandung senyawa golongan seskuiterpen lakton yaitu deoxyelephantopin dan isodeoxyelephantopin (Geetha *et al.*, 2012). Ekstrak etanol tapak liman menunjukkan sifat toksisitas terhadap sel kanker serviks (Hela) (Nurkhasanah *et al.*, 2015). Fraksi nonpolar menunjukkan aktivitas menginduksi kematian secara apoptosis (Listyowati and Nurkhasanah, 2014). Ekstrak etanol tapak liman menunjukkan sitotoksitas terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan IC<sub>50</sub> 15 µg/mL (Ho *et al.*, 2011). Wardati (2017) juga melaporkan bahwa fraksi kloroform ekstrak daun tapak liman memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC<sub>50</sub> yaitu 7,06 µg/mL. Nilai IC<sub>50</sub> yang rendah dari ekstrak maupun fraksi diatas menunjukkan bahwa ekstrak tapak liman sangat potensial untuk dikembangkan sebagai antikanker.

Kajian mekanisme ekstrak tapak liman pada sel MCF-7 mendapatkan bahwa ekstrak tapak liman meningkatkan peran p53 dalam apoptosis (Ho *et al.*, 2011). Mutasi pada gen p53 merupakan mutasi yang banyak terjadi pada penyakit kanker termasuk kanker payudara. Mutasi pada gen ini menyebabkan hilangnya *growth suppression* dan menyebabkan progresi siklus sel yang tidak terkontrol yang mengarah ke kanker. Pada sel normal, p53 berperan dalam menginduksi terjadinya apoptosis (Vousden and Lu, 2002).

Penelitian ini diperlukan untuk mengetahui pengaruh fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman terhadap ekspresi p53 pada sel T47D. Sel T47D adalah turunan sel kanker payudara yang mengekspresikan protein p53 yang termutasi dan merupakan sel kanker payudara dengan reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) positif (Dogan *et al.*, 2015). Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai mekanisme tapak liman (*Elephantopus scaber*) sebagai antikanker.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan utama penelitian berupa daun tapak liman diperoleh dari Merapi Herbal Farma, Yogyakarta. Subyek uji imunositokimia ini adalah sel T47D yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada.

### Jalannya Penelitian

#### Ekstraksi dan fraksinasi

Simplisia tapak liman dipisahkan bagian daunnya dengan bagian lain yang tidak dibutuhkan. Daun tapak liman dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan oven. Daun tapak liman lalu diserbuk secara manual dan diayak menggunakan ayakan mesh 20/40. Selanjutnya serbuk yang lolos pada ayakan mesh 20 dan tidak lolos pada ayakan mesh 40 digunakan untuk ekstraksi.

Sebanyak 200 gram serbuk simplisia daun tapak liman diekstraksi dengan 900 mL etanol 96% menggunakan metode maserasi. Ekstrak cair dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath*. Ekstrak kental sebanyak 10 gram ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL

petroleum eter. Larutan dilakukan penggojokan lalu diamkan selama semalam. Selanjutnya tuang enap dan saring filtrat sehingga diperoleh sari petroleum eter dan residu.

Residu yang diperoleh kemudian dilarutkan kedalam kloroform sebanyak 100 mL. Selanjutnya dilakukan penggojokan dan didiamkan selama semalam. Filtrat lalu dituang enap dan disaring sehingga diperoleh sari kloroform. Selanjutnya uapkan hasil sari kloroform didalam lemari asam hingga diperoleh fraksi kental kloroform.

### **Pembuatan larutan uji**

Sebanyak 10 mg fraksi kloroform ekstrak daun tapak liman ditimbang dan dilarutkan dalam 1000  $\mu\text{L}$  DMSO. Konsentrasi sampel menjadi 10.000  $\mu\text{g/mL}$ . Dari konsentrasi tersebut diencerkan menggunakan media RPMI untuk mendapatkan kadar 7,06  $\mu\text{g/mL}$  dan 3,53  $\mu\text{g/mL}$ . Kadar 7,06  $\mu\text{g/mL}$  dibuat dengan cara mengambil 100  $\mu\text{L}$  sampel dan ditambahkan 900  $\mu\text{L}$  RPMI. Dari larutan tersebut ambil 7  $\mu\text{L}$  lalu media RPMI ditambahkan sebanyak 993  $\mu\text{L}$  sehingga konsentrasi menjadi 7  $\mu\text{g/mL}$ . Dari larutan tersebut diambil 500  $\mu\text{L}$  lalu ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  RPMI sehingga konsentrasi menjadi 3,5  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Uji immunositokimia**

Sel T47D ditumbuhkan dalam mikroplate 24 sumuran dan dibiarkan melekat dan tumbuh dalam inkubator semalam. Mikroplate 24 sumuran diambil dari inkubator lalu dibuang semua media kultur dari tiap sumuran menggunakan mikropipet. Sebanyak 1 mL sampel dalam RPMI dengan konsentrasi 7,06  $\mu\text{g/mL}$  dan 3,53  $\mu\text{g/mL}$ , diambil dan ditransferkan kedalam sumuran kecuali kontrol. Sel kemudian diinkubasi 24 jam. Setelah inkubasi, semua media kultur dibuang dari sumuran dan sebanyak 300  $\mu\text{L}$  PBS ditambahkan dan didiamkan 5 menit. Larutan PBS dibuang dan ditambahkan 300  $\mu\text{L}$  aquades, didiamkan 5 menit lalu aquades dibuang. Sebanyak 300  $\mu\text{L}$  metanol ditambahkan dan didiamkan 10 menit lalu metanol dibuang. Sumuran dicuci dengan 300  $\mu\text{L}$  PBS sebanyak 2 kali. Larutan PBS dibuang dan ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  larutan hidrogen peroksida dan didiamkan 5-10 menit. Larutan dibuang dan dicuci dengan 300  $\mu\text{L}$  PBS sebanyak 2 kali.

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  *prediluted blocking* serum ditambahkan lalu didiamkan 10-15 menit. Larutan dibuang lalu ditambahkan antibodi monoklonal primer anti p53 sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi 24 jam. Sumuran dicuci dengan 300  $\mu\text{L}$  PBS sebanyak 2 kali. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  antibodi sekunder ditambahkan dan didiamkan 20 menit. Sel dicuci dengan 300  $\mu\text{L}$  PBS 2 kali. Larutan 100  $\mu\text{L}$  HRP ditambahkan dan didiamkan 10 menit lalu dibuang larutannya. Sumuran dicuci dengan PBS.

Larutan DAB ditambahkan dan didiamkan 2 menit. Sebanyak 500  $\mu\text{L}$  aquades ditambahkan lalu dibuang. Sumuran digenangi dengan 100  $\mu\text{L}$  larutan mayer hematoksilin lalu didiamkan 5 menit. Sebanyak 500  $\mu\text{L}$  aquades ditambahkan lalu dibuang. Tahap ini diulang hingga warna biru larutan mayer hematoksilin hilang. *Coverslip* diambil dan diletakan diatas objek *glass*. Etanol absolut ditambahkan pada *coverslip* lalu dikeringkan. Larutan xilol ditambahkan dan juga larutan etilen. *Coverslip* ditutup dengan *coverglass*. Ekspresi protein p53 diamati menggunakan mikroskop cahaya.

### **Analisis Data**

Pengamatan ekspresi protein p53 dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan p53 akan memberikan warna coklat di inti sel sedangkan yang tidak mengekspresikan p53 berwarna biru atau ungu. Persentase sel yang terekspresi dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Persentase ekspresi p53} = \frac{\text{Jumlah sel yang terekspresi}}{\text{Jumlah sel seluruhnya}} \times 100\%$$

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kanker payudara umumnya bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma (keganasan tumor epitelial). Perubahan fungsi pada sel epitelial duktal payudara normal ke invasi dan metastasis memerlukan beberapa perubahan genetik yang mampu mengarah ke progresi tumor. Beberapa perubahan genetik yang terjadi pada BRCA, p53 dan ESR diduga menjadi penyebab terjadinya kanker payudara. Mutasi pada gen p53 menjadi faktor

predisposisi dari individu dengan *Li-Fraumeni syndrom* yang mempunyai resiko tinggi terhadap kanker (Malkin, 2001).

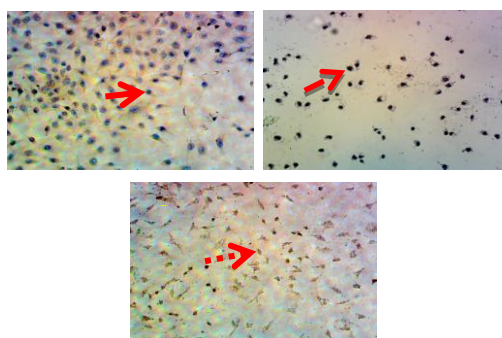
Mutasi p53 berhubungan dengan tumor yang memiliki ER-negatif, tingkat histologi tinggi, dan ekspresi EGFR yang berlebihan. Keterlibatan mutasi p53 dengan beberapa faktor diatas mempengaruhi *growth factor* yang mengarah pada peningkatan proliferasi sel dan/atau mengarah pada manifestasi lain yang menimbulkan tumor. Mutasi gen p53 mengakibatkan hilangnya ekspresi protein p53 atau meningkatnya ekspresi protein p53 abnormal. Perubahan genetik ini berakibat pada perubahan konformasi protein yang menyebabkan ketidakmampuan untuk berikatan dengan DNA dan menekan proliferasi sel. p53 mutan juga mampu berikatan dengan onkogen tertentu yang mampu menginduksi transformasi sel dan menimbulkan progresi tumor (Suyanto *et al.*, 2008). Sel T47D adalah turunan sel kanker payudara yang mengekspresikan protein p53 yang termutasi dan merupakan sel kanker payudara dengan reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) positif (Dogan *et al.*, 2015)

Tapak liman telah dilaporkan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker. Beberapa senyawa yang telah diisolasi dari tapak liman dari golongan seskuiterpen lakton menunjukkan sifat sitotoksik terhadap beberapa turunan sel kanker (Ho *et al.*, 2011; Kabeer *et al.*, 2014). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa fraksi nonpolar mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks (Hela) (Listyowati and Nurkhasanah, 2014). Aktivitas fraksi kloroform terhadap sel T47D ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  yang sangat rendah (7,06  $\mu\text{g/mL}$ ) (Wardati, 2017). Pada penelitian ini fraksi kloroform menunjukkan aktivitasnya meningkatkan ekspresi p53 seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

Pengamatan ekspresi p53 pada penelitian ini dilakukan dengan metode imunositokimia tidak langsung. Metode ini dilakukan setelah uji sitotoksik. Hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi kloroform ekstrak daun tapak liman diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 7,06  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $IC_{50}$  ini dijadikan acuan untuk melakukan uji imunositokimia. Hasil uji imunositokimia pada sel T47D yang diberi perlakuan fraksi kloroform ekstrak tapak liman disajikan pada Gambar 1.

Pada kelompok kontrol sel T47D masih dalam keadaan normal atau tidak mengalami perubahan secara morfologi. Pewarnaan sel menggunakan metode tidak langsung yang melibatkan antibodi monoklonal primer dan sekunder memperlihatkan kondisi sel kelompok kontrol yang nampak berwarna biru. Berdasarkan pengamatan diperoleh rata-rata persentase ekspresi p53 *wild type* pada kontrol sel T47D adalah sebesar  $5,08\% \pm 4,46$ . Timbulnya ekspresi ini dapat terjadi disebabkan karena pengaruh sel kanker yang digunakan. Tiap sel kanker memiliki kecepatan mitosis, indeks proliferasi, adanya ER (Bosari *et al.*, 1992), dan tipe sel yang berbeda-beda serta penggunaan jenis antibodi p53 juga mempengaruhi ekspresi p53 disebabkan tiap antibodi memiliki spesifitas dan sensitivitas yang berbeda (Bosari and Viale, 1995).

Perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman terhadap sel T47D mengindikasikan terjadinya apoptosis yang ditandai dengan perubahan morfologi sel. Kelompok perlakuan 3,53  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan perubahan sel T47D yang mengalami penyusutan dan menjadi bulat (sirkuler) serta adanya tonjolan ireguler pada membran sel. Perbedaan morfologi ini terlihat jelas bila dibandingkan dengan sel T47D pada kelompok kontrol yang masih berbentuk epitelial dengan bentuk nukleus dan membran plasma dapat dibedakan. Secara morfologi apoptosis biasanya ditandai dengan sel yang menyusut dan membulat, *blebbing*, terbentuk badan apoptotik, dan kondensasi (kariopiknosis) dan fragmentasi nukleus (karioreksis). Pada nekrosis, sel akan membesar dan membentuk struktur seperti balon (onkosis) tanpa adanya kariopiknosis dan karioreksis (Berghe *et al.*, 2013).



**Gambar 1.** Foto mikroskopis ekspresi p53 dengan imunositokimia pada sel T47D setelah diberi perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman pada berbagai konsentrasi. A. Kontrol sel; B. 3,53 µg/mL; C. 7,06 µg/mL. (→) Tidak menunjukkan ekspresi p53, (-→) menunjukkan apoptosis da (···→) menunjukkan apoptosis tahap akhir

Hasil kuantifikasi jumlah ekspresi p53, dapat dilihat pada Tabel I. Perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol tapak liman pada konsentrasi 3,53 µg/mL menunjukkan peningkatan ekspresi yang signifikan dibandingkan kontrol. Sedangkan perlakuan fraksi dengan konsentrasi 7,06 µg/mL, ekspresi p53 tidak terdeteksi lagi, karena sel sudah menunjukkan apoptosis pada tahap akhir (nekrosis).

**Tabel I.** Rata-rata persen ekspresi p53 pada sel T47D yang diberi fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman

Kelompok	Rata-rata % ekspresi p53	Keterangan
Kontrol	5,08 ± 4,46	
3,53 µg/mL	99,42 ± 1,28	
7,06 µg/mL	Tidak terdeteksi	Sel-sel telah mengalami apoptosis tahap akhir kearah nekrosis

Pada jalur intrinsik, p53 sebagai faktor transkripsi berperan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi gen-gen proapoptosis seperti Bax, Bid, Noxa dan PUMA. Protein Bax dan Noxa akan melakukan penetrasi kedalam membran mitokondria yang menyebabkan keluarnya sitokrom c kedalam sitoplasma. Sitokrom c akan berikatan dengan Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktifasi caspase 9. Caspase 9 akan mengaktifasi procaspase 3 menjadi caspase 3 yang berperan sebagai efektor dalam melaksanakan apoptosis (Skommer *et al.*, 2007).

Pada kelompok perlakuan 7,06 µg/mL, sel T47D telah mengalami tahap akhir fase apoptosis yang mengarah pada *secondary necrosis*. *Secondary necrosis* merupakan suatu proses yang terjadi pada sel yang telah mengalami apoptosis tahap akhir pada kultur sel (*in vitro*). Sel yang mengalami *secondary necrosis* ditandai dengan fragmentasi nukleus dan kondensasi kromatin (Silva *et al.*, 2008). Ketiadaan sel-sel lain yang mampu fagositosis badan-badan apoptotik seperti makrofag menyebabkan sel akan mengalami *secondary necrosis* yang berakhir pada autolisis sel (Silva, 2010)

Perubahan morfologi sel T47D ke arah apoptosis setelah pemberian fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman diduga disebabkan kandungan fraksi kloroform yaitu seskuiterpen lakton. Seskuiterpen lakton adalah senyawa yang memiliki gugus  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton dan  $\alpha,\beta$ -tak jenuh siklopenton yang memiliki aktivitas anti tumor secara *in vivo*. Selain itu adanya gugus  $O=C-C=CH_2$  dan penambahan gugus alkil mampu meningkatkan aktivitas sitotoksik seskuiterpen lakton (Chaturvedi, 2011).

## KESIMPULAN

Fraksi kloroform ekstrak etanol tapak liman meningkatkan ekspresi p53 dan memacu kematian sel T47D secara apoptosis. Ekstrak tapak liman potensial untuk dikembangkan sebagai antikanker.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas pendanaan melalui Hibah Penelitian Produk Terapan 2016.

## DAFTAR PUSTAKA

- Berghe, T. Vanden, Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V, Takahashi, N., Vandenaabeele, P., 2013. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 3: 1–13.
- Bosari, S., Lee, A.K.C., Viale, G., Hcatley, G.J., Coggi, G., 1992. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 421: 291–295.
- Bosari, S., Viale, G., 1995. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Arch* 427: 229–241
- Chaturvedi, D., 2011. 10 . Sesquiterpene lactones : Structural diversity and their biological activities. *Res. Signpost* 661: 313–334.
- Dogan, S.M., Ercetin, A.P., Altun, Z., Dursun, D., Aktas, S., 2015. Gene expression characteristics of breast cancer stem cells. *JBUON* 20: 1304–1313.
- Geetha, B.S., Nair, M.S., Latha, P.G., Remani, P., 2012. Sesquiterpene Lactones Isolated from *Elephantopus scaber* L . Inhibits Human Lymphocyte Proliferation and the Growth of Tumour Cell Lines and Induces Apoptosis In Vitro. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 1–7.
- Ho, W.Y., Yeap, S.K., Ho, C.L., Raha, A.R., Suraini, A.A., Alitheen, N.B., 2011. *Elephantopus scaber* induces cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells via p53-induced apoptosis. *J. Med. Plants Res.* 5: 5741–5749.
- Kabeer, F.A., Sreedevi, G.B., Nair, M.S., 2014. Isodeoxyelephantopin from *Elephantopus scaber* ( Didancao ) induces cell cycle arrest and caspase-3-mediated apoptosis in breast carcinoma T47D cells and lung carcinoma. *Chin. Med.* 9: 1–9.
- KemenkesRI, 2015. Situasi Penyakit Kanker. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, Jakarta
- Listyowati, Y., Nurkhasanah, 2013. Efek sitotoksik dan pemacuan apoptosis fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman ( *Elephantopus scaber* linn ) terhadap sel Hela. *Pharmaciana* 3 (2) 1–7.
- Malkin, D., 2001. The role of p53 in human cancer. *J. Neuro Oncol.* 51: 231–243.
- Nurkhasanah, Trisnamurti, K.C., Gunaryanti, R.D., Widyastuti, T., 2015. The Screening Of Cytotoxic Fraction From *Elephantopus scaber* Linn against Human Cervical Cancer ( Hela ) Cells. *Int. J. Pharma Sci. Res.* 6: 1011–1014.
- Silva, M.T., 2010. Secondary necrosis : The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* 584: 4491–4499.
- Silva, M.T., Vale, A. do, Santos, M.N.N., 2008. Secondary necrosis in multicellular animals : an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13: 463–482.
- Skommer, J., Wlodkowic, D., Deptala, A., 2007. Larger than life : Mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk. Res:* 31, 277–286.
- Suyanto, Y.P., Utomo, R.A., Sandra, F., 2008. p53 dan cancer payudara. *Indones. J. Cancer* 4, 138–143.
- Vousden, K.H., Lu, X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature* 2: 594–604.
- Wardati, K.Z., 2017, Aktivitas sitotoksik dan pemacuan apoptosis fraksi kloroform ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) terhadap sel kanker payudara T47D, *Skripsi*, Program Sarjana Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan.