



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
LEMBAGA PENELITIAN**

Alamat : Jl. Kalimantan No. 37 Jember Telp. 0331-337818, 339385 Fax 0331-337818

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH DELIMA TERSRANDAR 40%
ELLAGIC ACID TERHADAP SEL MUKOSA RONGGA MULUT MENCIT YANG
MENGALAMI TRANSFORMASI KE KARSINOMA SEL SKUAMOSA AKIBAT
INDUKSI BENZOPIRENE**

Peneliti : **Sri Hernawati, drg, M.Kes**
Sumber dana : **Disentralisasi**

KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER

ABSTRACT

Tumor ganas rongga mulut adalah tumor yang tumbuhnya cepat, infiltrasi ke jaringan sekitarnya. Peningkatan kanker rongga mulut pada laki – laki dijumpai 20.000 kasus setiap tahunnya, pada wanita sekitar 10,000 kasus setiap tahunnya. Lebih dari 80% kasus kanker rongga mulut adalah karsinoma sel skuamosa. Karsinoma sel skuamosa adalah kanker yang berasal dari jaringan epitel .Pada kasus yang bermetastasis luas, sekitar 30 -65 % pasien meninggal dunia dalam waktu 5 tahun.

Berbagai upaya penatalaksanaan penyakit kanker masih banyak menemui kendala, termasuk radiologi dan kemoterapi , menimbulkan efek samping dapat membunuh sel yang normal . Buah delima mudah di dapat dan harganya murah . Ellagic acid (EA) senyawa tunggal bahan aktif dari whole ekstrak buah delima (PGL) memiliki aktivitas sebagai anti kanker secara invitro tetapi ellagic acid (EA) aktivitas dan konsentrasinya dalam plasma rendah , kelarutan dalam air rendah , metabolisme (EA) tidak larut dalam intestinal. Fakta ini mendorong peneliti untuk membandingkan dengan PGL yang terdiri dari beberapa senyawa bahan aktif, tidak hanya ellagic acid . Tujuan penelitian ini membandingkan antara EA, senyawa tunggal pada PGL dengan PGL dalam meningkatkan apoptosis . Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratories,32 ekor mencit (Balb/c), jantan,umur 5 bulan dibagi secara random menjadi 4 kelompok; 2 kelompok kontrol (K0; tidak dipapar benzopirene dan tidak diberi perlakuan, K1; dipapar benzopirene dan tidak diberi perlakuan), 2 kelompok perlakuan (P1;

dipapar benzopirene dan diberi EA, P2; dipapar benzopirene dan diberi PGL. Pemeriksaan dengan menggunakan teknik tunnel assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian PGL dapat meningkatkan apoptosis sel ganas mukosa rongga mulut mencit lebih tinggi EA . Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian PGL dapat membunuh sel ganas pada rongga mulut mencit dengan jalan meningkatkan apoptosis lebih tinggi dibandingkan pemberian EA.

Kata Kunci : Delima (PGL) , Ellagic Acid Sel Ganas, Apoptosis

Korespondensi (correspondence): Sri Hernawati. Bagian Oral Medicine. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121. Indonesia.

EXECITIVE SUMMARY

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH DELIMA TERSRANDAR 40% ELLAGIC ACID TERHADAP SEL MUKOSA RONGGA MULUT MENCIT YANG MENGALAMI TRANSFORMASI KE KARSINOMA SEL SKUAMOSA AKIBAT INDUKSI BENZOPIRENE

Peneliti : **Sri Hernawati, drg, M.Kes**
Sumber dana : **Disentralisasi**
Kontak Email : **srihernawati.drg5@yahoo.com**

KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER

PENDAHULUAN

Presentase dari insiden kanker di dunia bervariasi, insiden kanker rongga mulut pada laki – laki sekitar 4 %. Insiden kanker pada rongga mulut wanita sekitar 2 %.^{1,5} Karsinoma sel skuamosa rongga mulut biasanya tidak menimbulkan keluhan pada tahap awal, pasien dengan karsinoma sel skuamosa pada mukosa bukal 68% dan sebesar 48 % menyebar ke *nodes limfa*.³

Indeks survival pasien terus merosot dibanding kemajuan dalam hal diagnosis dan pengobatan kanker .⁴ Gambaran mikroskopis karsinoma sel skuamosa menunjukkan proliferasi sel – sel epitel skuamous, yang mengalami atipia disertai perubahan bentuk *rete peg processus* , pembentukan keratin yang abnormal ,pertambahan basaloid sel ,susunan sel menjadi tidak teratur dan membentuk tumor nest yang berinfiltrasi ke jaringan sekitarnya .⁵

Pertumbuhan karsinoma sel skumosa rongga mulut dipengaruhi faktor *eksogen* dan *endogen* , yang dapat mengakibatkan fungsi protein menjadi abnormal akibat mutasi gen. Apoptosis yang mengalami kegagalan juga sangat berperan terhadap pertumbuhan dan perkembangan karsinoma sel skuamosa.⁶

Apoptosis dapat terjadi secara fisiologis dan patologig. Apoptosis fisiologis merupakan proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan dan berperan penting menjaga homeostatis . Apoptosis patologis adalah kematian sel karena rangsangan , proses apoptosis dapat melalui beberapa jalur antara lain, jalur intrinsik dan ekstrinsik ,dapat melalui aktivitas wildp53, jalur sitotoksik, kompleks fas dan ligand.⁷

Berbagai upaya penatalaksanaan penyakit kanker masih banyak menemui kendala, yang mengakibatkan kurangnya keberhasilan dalam mencegah dan mengobati kanker. Salah satu upaya

pengobatan yang sudah dirintis sejak jaman dulu adalah pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat. Salah satu tanaman obat adalah buah delima (PGL). Kelompok utama fitokimia buah delima (PGL) adalah *polyphenol*, yang terdiri dari *flavonoids* (*flavonols*, *flavonols* dan *anthocyanins*), *hydrolyzable tannins* (*ellagitannins* dan *gallotannins*) dan *condensedtannins*

Buah delima memiliki khasiat terapeutik antara lain ; anti bakteri, anti virus ant kanker anti inflamasi, berdasarkan peneliti sebelumnya .⁹ Whole ekstrak buah delima (PGL) dengan standarisasi 40 % *ellagic acid* (EA) dapat menghambat perkembangan sel kanker, anti proliferasi, menginduksi apoptosis dan anti oksidan secara *invitro*.¹⁰ Ekstrak buah delima dapat meningkatkan apoptosis secara *invitro* pada biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dengan dosis 250 ug /ml.¹¹ Standarisasi 40% *ellagic acid* (EA) , 40% dapat menggambarkan kekuatan delima yang bertanggung jawab terhadap aktivitas farmakologi .¹²

Whole ekstrak buah delima (PGL) mengandung bahan aktif yaitu *ellagic acid* (EA) .*Ellagic acid* dalam whole ekstrak buah delima(PGL) dalam bentuk bebas sebagai *ellagic acid-glycosides* atau terikat dalam bentuk *ellagitannins* .¹³ *Ellagic acid* (EA) secara *invitro* berfungsi sebagai anti kanker tapi masih jarang diteliti secara *invivo*. Aktivitas dan konsentrasi *ellagic acid* (EA) dalam plasma rendah di sebabkan kelarutan dalam air rendah , disamping itu *ellagic acid* (EA) mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum di absorpsi.¹³ Kelebihan whole ekstrak buah delima (PGL) mempunyai beberapa bahan aktif yang kemungkinan bekerja sinergis , diantaranya *polyphenol* dalam whole ekstrak buah delima dapat meningkatkan kelarutan dan absorpsi *ellagic acid* , sehingga whole ekstrak buah delima (PGL) mempunyai efek anti kanker yang lebih poten.¹³ Apabila efek whole ekstrak buah delima (PGL) pada mencit *Strain Swiss Webster (Balb/c)* dapat terungkap, maka whole ekstrak buah delima (PGL) dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif pengobatan terhadap karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

Bahan dan Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental laboratorium*. Mencit yang digunakan adalah *Strain Swiss Webster (Balb/c)*, berat badan berkisar 30- 50 gram,jenis kelamin jantan, umur 5 bulan, diperoleh dari unit hewan coba Universitas Gajahmada, Yogyakarta.

Mencit dibagi 4 kelompok ; 2 kelompok kontrol yaitu; K0 (tidak di papar *benzopirene* dan tidak diberi perlakuan(EA,PGL),K1(dipapar*benzopirene* dan tidak diberi perlakuan (EA, PGL

),P2 kelompok perlakuan ; P1(dipapar *benzopirene* dan EA), P2 (dipapar *benzopirene* dan diberi perlakuan PGL, tiap kelompok ada 8 ekor mencit. PGL diperoleh dengan cara ekstraksi seluruh bagian buah delima dalam bentuk serbuk dan telah terstandarisasi salah satu bahan kandungannya adalah 40 % EA, di produksi oleh *Xi an Biof Biotechnology Co.Ltd (Room 1-1111, High- tech Venture Park , NO .69 Jinye Rood Gaoxin Distric of Xian ,People Republic of China)*. EA adalah kristal putih merupakan salah satu komponen bahan aktif PGL berasal dari perusahaan yang sama dengan PGL.

Mencit di papar *benzopirene* 0.04 mg /0,04 ml *olium olivarum* secara per oral seminggu 3 kali selama 4 minggu pada mukosa bukal sebelah kanan rongga mulut mencit, Pada akhir minggu ke 9 jaringan mukosa rongga mulut mencit di biopsi , kemudian dikorbankan. Hewan model karsinoma sel skuamosa adalah mencit (Balb/c) yang telah mengalami keganasan pada epitelnya akibat paparan *benzopirene* dengan gambaran mikroskopis ; menunjukkan proliferasi sel – atipia epitel skuamous, yang dsertai perubahan bentuk *rete peg processus*, pembentukan keratin yang abnormal,susunan sel tidak teratur.

Whole ekstrak buah delima (PGL) , *ellagic acid* (EA) diberikan per oral setiap hari selama 4 minggu . Dosis whole ekstrak buah delima (PGL), *ellagic acid* (EA) adalah 75 mg/kg/bb/hari dilarutkan dalam CMC-Na 0,3 %. Pemeriksaan untuk ekspresi apoptosis dengan menggunakan tunnel assay. Prosedur tunnel assay ekspresi apoptosis meliputi ((1) persiapan reagen : tahap fiksasi, larutan kerja DAB,(2) pewarnaan, (3) pencucian ,(4) pelebelan,(4) pembacaan.

Pemeriksaan Tunnel Assay

Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia : H202 3%,tripsin 0,025 %, PBS, aquadestilata, buffer substrat, xylol, etanol absolut, metanol, air, kit apoptosis (mouse anti rat) antibodi, enzim, kaca obyek poli L-lisin, buffer formalin, labeled antiglobulin,sekunder antibody, streptavidin. Prosedure pemeriksaan tunnel assay meliputi ; persiapan reagen, pewarnaan, pencucian ,pelebelan ,pembacaan.

Gambaran tunnel assay me- nunjukkan sel yang mengekspresikan apoptosis berrwarna coklat. .Penghitungan sel dilakukan pada 10 lapangan pandang dengan mikroskop menggunakan pembesaran 400x dan disajikan reratanya. Analisis data penelitian menggunakan uji normalitas , uji homogenitas , uji ANOVA ,uji LSD. Hasil analisis antar kelompok perlakuan menggunakan LSD.

Hasil

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik tunnel assay ekspresi apoptosis terlihat pada Gambar 1 dan Tabel 1. Gambar 1, dengan teknik tunnel assay menunjukkan warna coklat dengan mikroskop pembesaran 400x.

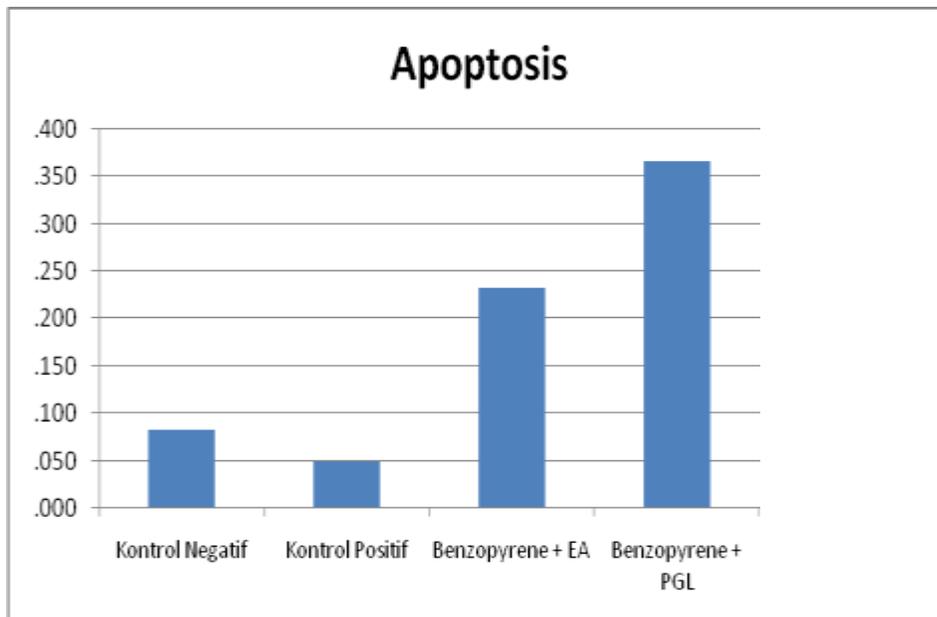


Gambar 1. Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik tunnel assay ekspresi sel apoptosis (positif) warna coklat

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku ekspresi sel yang mengalami apoptosis Hewan Percobaan

Kelompok (n=6)	Jumlah sel yang mengekspresikan Apoptosis (rerata ± SD)
Kontrol (-) / K0	0.083 ± 0.132 ^a
Kontrol (+) / K1 (benzopyrene + CMC)	0.050 ± 0.054 ^a
P1 / (benzopyrene + EA)	0.233 ± 0.081 ^b
P2/(benzopyrene+PGL)	0,317 ±0,172

*) Superskrip yang berbeda pada kolom yang Sama berbeda nyata ($p < 0,05$).



Gambar 2. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Sel yang Mengekspresikan apoptosis Pada Hewan Percobaan.

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik *tunnel assay* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandar (P2/*benzopirene* + PGL) dapat menaikkan ekspresi sel yang mengalami apoptosis pada sel mukosa rongga mulut bukal sebelah kanan yang mengalami transformasi ke karsinoma sel skuamosa pada mencit sebagai hewan coba. Kenaikan sel yang mengekspresikan apoptosis pada kelompok P2 (*benzopirene* + PGL) tertinggi ($0,367 \pm 0,196$) tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P1 (*benzopirene* + EA) ($0,233 \pm 0,081$) tetapi berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok K0 /K-, K1/ K0. .

PEMBAHASAN

Berdasarkan Tabel 1 Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak buah delima (PGL) terstandar terhadap peningkatan apoptosis pada sel mukosa rongga mulut mencit akibat paparan *benzopirene*, menunjukkan bahwa ekstrak buah delima (PGL) menaikkan apoptosis pada kelompok P2 (*benzopirene* + PGL) ($0,366 \pm 0,196$), kelompok P2 (whole ekstrak buah delima) menunjukkan hasil kenaikan apoptosis paling tinggi dibandingkan kelompok lain.

Kanker ditandai dengan proliferasi sel yang tidak terkendali apoptosis yang terhambat. Sel *immortal*, *invasi* dan *metastasis* ke organ-organ lain. Apoptosis adalah suatu proses kematian sel terprogram yang terjadi secara teratur untuk menghilangkan berbagai sel yang tidak diperlukan tanpa respons inflamasi .¹⁸ Apoptosis terjadi secara normal selama masa perkembangan dan penuaan. Mekanisme tersebut merupakan mekanisme homeostasis untuk menjaga dan memelihara populasi sel di dalam jaringan. Apoptosis juga berfungsi sebagai mekanisme pertahanan seperti pada reaksi imun atau ketika sel rusak karena suatu penyakit atau gen toksik. Karakteristik apoptosis adalah terjadi fragmentasi DNA, kondensasi kromatin, pengerutan sitoplasma dan sel akan mati tanpa lisis sehingga tidak merusak sel atau jaringan sekitarnya .^{18,19}

Apoptosis merupakan proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel. Salah satu peran penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel yang berlebihan pada sel kanker.⁷ Target-target multi fungsional dan aktivasi beberapa jalur khusus apoptosis penting dalam terapi kanker untuk mencegah perkembangan resistensi obat dalam terapi kanker.¹⁹

Setiap sel akan merespon semua stres atau stimulus yang diterimanya melalui berbagai macam cara baik melalui aktivasi sinyal kehidupan sampai inisiasi kematian sel. Tujuan dari proses tersebut adalah menjaga homeostasis, sehingga sel yang tidak diperlukan akan dieliminasi. Mekanisme tersebut tergantung pada berbagai macam faktor dan kemampuan sel untuk mengatasi stres atau stimulus.²¹ stimulus yang diberikan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah delima (PGL) dan bahan tersebut menunjukkan dapat meningkatkan apoptosis.

Apoptosis merupakan suatu mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan mungkin berbahaya sehingga dapat menyelamatkan organisme. Pada proses apoptosis dapat terjadi kegagalan, yang akan menyebabkan terjadinya kanker, karena sel yang mengalami mutasi terus menerus akan replikasi secara tidak terkendali. *Wild p53* merupakan tumor supresor gen yang akan teraktivasi jika sel memiliki gen yang cacat (*gene defect*). Fungsi dari *wild p53* ini mencegah replikasi sel pada sel yang rusak atau mutasi secara genetik melalui penghentian siklus sel pada *fase G1* atau interfase, sehingga sel mempunyai waktu untuk *repair*. Selain itu gen ini juga berfungsi untuk mencetuskan apoptosis.^{6,14}

Hasil penelitian menunjukkan bahwa whole ekstrak buah delima (PGL) terstandar memiliki kemampuan meningkatkan ekspresi apoptosis yang paling tinggi dibanding kelompok

lainnya. Ekstrak buah delima (PGL) terstandar mengandung beberapa bahan aktif, yang secara individual menunjukkan aktivitas anti kanker pada sel kanker prostat. Namun bila dikombinasi dari semua bahan dalam whole ekstrak buah delima menunjukkan aktivitas yang berlipat ganda.¹⁵

Peningkatan ekspresi *wild p53* dibanding *ellagic acid* lebih tinggi karena *ellagic acid* mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum diabsorpsi, kelarutannya rendah dalam air. Metabolisme *ellagic acid* tidak larut dalam intestinal.¹⁶

Ellagic acid pada penelitian secara invitro menunjukkan dapat meningkatkan ekspresi reseptor kematian antara lain; TRAIL R2 / DR5. DR5 mengikat stimuli kematian dan menyebabkan aktivasi *pro-caspase 8*. Cros talk antara jalur khusus apoptosis ekstrinsik (melalui reseptor kematian) dan jalur intrinsik melalui mitokondria.²⁰

Ellagic acid dapat menghambat ekspresi protein IAP dan ekspresi protein XIAP pada penelitian secara invitro, sebagian besar kanker menunjukkan over ekspresi protein IAP dan XIAP. Protein IAP untuk melindungi sel kanker dari stimuli kematian sehingga beberapa terapi antikanker menargetkan menghambat ekspresi IAP untuk membunuh sel kanker. XIAP supresor apoptosis paling kuat, XIAP mengikat dan menghambat *caspase-3*, *caspase -7* dan *caspase-9*, dengan efek *ellagic acid* yang dapat menghambat XIAP, apoptosis bisa terjadi.²⁰

Ellagic acid (C141-1608) secara invitro pada sel PaCa-2 menghambat aktivitas faktor transkripsi NF-kB. NF-kB adalah faktor transkripsi utama yang biasanya memiliki peran antiapoptosis pada sel-sel kanker. NF-kB menghambat apoptosis dengan jalan meningkatkan aktivitas Bcl-2 (anti apoptosis), Bcl-2 menghambat permeabilitas mitokondria yang menghambat pelepasan *cytochrom C* dan menekan Bax. *Ellagic acid* menurunkan aktivitas NF-kB,

menyebabkan Bcl-2 menurun, aktivitas jalur apoptosis mitokondria berjalan, terjadi pelepasan *cytochrome C* dan aktivasi caspase .²²

Pada penelitian secara *invitro* PC-3 kanker menunjukkan ekstrak buah delima (PGL) dapat menghambat pertumbuhan sel yang mengalami mutasi dan menginduksi apoptosis melalui modulasi protein yang mengatur apoptosis .¹⁰

Jus buah delima (PGL) dibandingkan dengan *ellagic acid* hasilnya menunjukkan jus buah delima (PGL) lebih kuat aktivitasnya sebagai *antiproliferasi*, menginduksi apoptosis dan antioksidan dibanding dengan aktivitas *ellagic acid* . Jus buah delima (PGL) dibandingkan dengan *ellagic acid* dan *poliphenol* (salah satu bahan aktif buah delima) pada sel lini LNCaP-AR, menunjukkan inhibitor yang kuat untuk menghambat pertumbuhan sel kanker dan menginduksi apoptosis (Maoli *et al.*, 2005).

Ellagic acid dapat menginduksi apoptosis dan menginduksi penahanan G1 pada sel T24 kanker bladder manusia. Kebanyakan penelitian masih secara *invitro*, kelemahan-kelemahan studi secara *invitro*, sensitivitas dan reaksi spesifik kurang mencerminkan hasil yang sebenarnya dan tidak selalu mencerminkan hasil studi secara *invivo*. Sehingga mendorong peneliti untuk melakukan penelitian secara *invivo* pada animal model, di samping itu berbagai penelitian yang sudah dilakukan tentang aktivitas ekstrak buah delima (PGL) terhadap apoptosis tidak menjelaskan mekanisme apoptosis.

Kelompok K0 (tanpa *benzopirene* dan tanpa perlakuan) apoptosis rendah ,pada kelompok K0 merupakan kelompok normal, secara fisiologis, sistem pertumbuhan sel dalam individu diatur oleh suatu keseimbangan, yaitu keseimbangan antara apoptosis dan proliferasi .⁸

KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah daya hambat whole ekstrak buah delima (kelompok P2) terhadap sel ganas rongga mulut mencit lebih tinggi dibanding *ellagic acid*.

Kata Kunci : Delima (PGL) , Ellagic Acid Sel Ganas, Apoptosis

DAFTAR PUSTAKA

1. Widyasari A, Retnoningsih D, Lassie N, 2008. Ekstrak etanol biji mahkota dewa *Phaleria Macrocarpa* (Scheff) Boerl) meningkatkan ekspresi caspase-3 aktif pada cell line CA Colon WIDR. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. PKMI-2-7-1.
2. Epstein J and Waal IV, 2008. Oral cancer. Textbook of oral medicine, Burket Eleventh Edition. BC Decker Inc Hamilton Press :153-167.
3. Wahyuni F, 2010. Karsinoma sel skuamosa yang didahului inflamasi kronis non-spesifik. Departemen Penyakit Mulut, Universitas Sumatera. Hal:3-9.
4. Mehrota R and Syadav. 2006. Oral squamous cell carcinoma, etiology, pathogenesis and prognostic of genomic alteration. Indian Journal of cancer Department of pathology. Motilal Nehru Medical colleg. University of Alhabad. Pp : 162.
5. Safriadi M, 2008. Patologi mulut tumor neoplastik dan non neoplastik rongga mulut .Textbook of Patologi Mulut.C.V Andi : 73-83
6. Kresno SB, 2011. Textbook Ilmu dasaronkologi. Edisi kedua. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesi. Hal 66-129.
7. Salido GM, Rosado JA. 2009. Apoptosis; involvement of oxidative stress and intracellular CA 2+ homeostasis. Dept of physiology. Universty of Extremadure. Spain.
8. Suidiana IK, 2008. Patobiologi molekuler kanker. Textbook Penerbit Salemba Medika : 27-90.
9. Lansky EP and Newman RA, 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for preventif and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109: 177-206.
10. Jurenka J, 2008. Therapeutic Application of pomegranate (*Punica granatum* L) : A Review *Alternative Medicine Review*, 13 (21) : 128-144.
11. Kholifah.M , pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum* Linn) terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia Sp-C1 invitro. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta. *Biomedika*, Vol 2 No 2, hal :72-80.
12. Saifudin A, Rahayu V, Teruna H Y. 2011. Textbook standardisasi bahan Obat alam. Edisi pertama. Graha Ilmu. Hal ;1- 26.
13. Saifudin A, Rahayu V, Teruna H Y. 2011. Textbook standardisasi bahan Obat alam. Edisi pertama. Graha Ilmu. Hal ;1- 26.
14. Lumangga F, 2008. Apoptosis. J departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan. Hal 1-7.
15. Seeram NP, Schulman RN, Heber D, 2006. Pomegranate ancient roots to modern Medicine 1st Ed. Taylor and Francis Group, New York .pp 2-99.
16. Seeram NP, Adam LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005. Invitro antiproliferative, apoptosis and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenol as found in pomegranate juice. *J of Nutr Biochem* 16 : 360-367.
17. Marzo L and Naval J, 2008. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *J Biochen Pharm* 76: 939-46.18. Gewes .2003. Introduction to apoptosis .Aporeview 1- 26.
18. Elmore S, 2007. Apoptosis a reiew Of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35 –

495 -516

19. Mohammad HF,2002.Ellagic Acid Mediated CK2 Inhibition, A Natural Multifunction strategi to trigger cer Cal cancer cell death invitri and in Vivo.Disertation on Department of Chemistry,Cleve Land State Univer Sity Pp; 1 -24
20. Samali A,Fulda S, Adrienne MG,Osa Mu H,Srinivasula SM,2010,Cell Stres and cell death .Int J Cell Biol .pp; 11 -15
21. Edderkaoui M,Odinokova I,OhnoI,GukovskyI,GoVLW,Pandol SJ,Gu Kovkaya AS,2008.
22. Ellagic acid indu Ces apoptosis through inhibition of Nuclear factor kB pancreatic cancer Cell,Jurnal of Gastroenterologi ISSN 1007 -9327,21,14 (230; 3672 -3680)

