

EFEK PROLIFERATIF EKSTRAK ETANOLIK KACANG PANJANG PADA SEL T47D

PROLIFERATIVE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF LONG BEAN ON T47D CELL

Aditya Fitriyanti*, Natasya Kana Wijayanti*, Nur Qumara Fitriyah*,
Ika Puspita Dewi*, Meti Puspita Mayasari* dan Edy Meiyanto**

*Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

**Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Farmasi UGM

ABSTRAKSI

Tanaman kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) adalah salah satu tanaman yang dipercaya masyarakat dapat memperbesar payudara. Tanaman ini mempunyai efek proliferasi terhadap sel payudara karena mengandung fitoestrogen, yaitu estrogen alamiah yang terdapat dalam tanaman. Senyawa ini dapat memacu proliferasi jika berikatan dengan reseptor estrogen. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanolik kacang panjang dalam memacu proliferasi sel payudara. Ekstrak etanolik kacang panjang konsentrasi 400, 300, and 200 µg/ml diuji aktivitas proliferasinya secara *in vitro* terhadap sel epitelial payudara (T47D). Uji doubling time dengan metode MTT dalam waktu inkubasi 0, 24, 48, and 72 jam. Untuk mengetahui tingkat proliferasi sel payudara dilakukan pemeriksaan jumlah AgNOR. Metode pengecatan imunositokimia dilakukan untuk mengetahui level ekspresi reseptor estrogen. Jumlah sel yang berproliferasi dengan pemberian ekstrak kacang panjang meningkat seiring lamanya waktu inkubasi. Konsentrasi kacang panjang yang masih dapat memberikan efek proliferasi maksimum pada jam ke-72 adalah konsentrasi 200 µg/ml. Penggunaan konsentrasi kacang panjang diatas 200 µg/ml menurunkan proliferasi sel. Hasil analisis statistik pengecatan mAgNOR menunjukkan bahwa ekstrak etanolik kacang panjang dapat meningkatkan tingkat proliferasi sel epitel payudara. Ekstrak tersebut juga dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen yang ditunjukkan dengan uji imunositokimia. Hal ini menunjukkan bahwa proliferasi sel yang terjadi berhubungan dengan mekanisme peningkatan ekspresi reseptor estrogen.

Kata kunci: Kacang panjang, proliferasi sel, sel T47D

ABSTRACT

Long bean (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) is one of the plants that is belief to enlarge breast cell. This plant has proliferative effect because it content phytoestrogen, a plant natural estrogen. Phytoestrogen bind to estrogen receptor and stimulate the proliferation of breast cell. This experiment was conducted to observe ethanolic extract effect of long bean on the stimulation of in breast cell proliferation. Proliferation activity of ethanolic extract of long beans 200, 300, dan 400 µg/ml were tested to T47D breast epithelial cell. Doubling time test were conducted by MTT method for 0, 24, 48, and 72 hour incubation time. Proliferation level of T47D breast epithelial cell were known by counting the number of mAgNOR. Estrogen receptor expression level in T47D breast epithelial cell were observed with immunocytochemistry staining method. The number of cell proliferating after ethanolic extract were added are rising along with the incubation time. Ethanolic extract 200 µg/ml give maximum proliferative effect after 72 hour incubation. Concentration above 200 µg/ml reduce cell proliferation. Statistic analysis of mAgNOR staining showed that ethanolic extract of long bean stimulate the proliferation level of breast epithelial cell. Ethanolic extract give positive estrogen receptor expression in T47D breast epithelial cell which shown by immunocytochemistry staining method.

Key words: Long bean, cell proliferation, T47D cell

PENDAHULUAN

Setiap wanita menginginkan bentuk tubuh yang indah dan ideal, termasuk payudara yang padat dan berisi. Banyak cara untuk merawat dan memperbesar ukuran payudara agar memperoleh bentuk payudara yang diinginkan. Salah satunya dengan ramuan

bahan alami dari tumbuhan. Tanaman kacang panjang digunakan masyarakat untuk merawat dan memperbesar payudara dengan cara menumbuk halus kulit and biji kacang panjang sampai keluar sarinya kemudian mengoleskannya pada payudara (Handri and Rafira, 2003).

Tanaman kacang panjang, mengandung fitoestrogen yang mempunyai 2 gugus hidroksil (-OH) berjarak 11,0-11,5Å, sama dengan estrogen (Achadiat, 2003). Oleh karena itu, fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan memberikan efek estrogenik (Gruber *et al.*, 2002) yaitu memacu perkembangan sel epitel payudara. Efek estrogenik terjadi karena sel epitel payudara sangat responsif terhadap estrogen. Sel epitel payudara mengekspresikan reseptor estrogen (ER) yang menstimulasi perkembangan payudara (Van De Graaff *and* Fox, 1995).

Senyawa-senyawa yang merupakan fitoestrogen antara lain flavonoid (flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan antosianidin), *coumestan*, lignan, dan stilben (Cornwell *et al.*, 2004; Ross *and* Kasum, 2002). Kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) mengandung flavonol, glikosida flavonol, dan antosianidin (Wong *and* Chang, 2004; Lattanzio *et al.*, 2000). Kacang panjang juga mengandung protein, karbohidrat, lemak, kalsium, besi, fosfor, potasium, sodium, vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, dan niasin (Handri *and* Rafira, 2003).

Khasiat kacang panjang dalam memperbesar payudara belum pernah diteliti, sehingga perlu penelitian dan bukti ilmiah mengenai efek proliferasi ekstrak etanolik kacang panjang terhadap sel epitel payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanolik kacang panjang terhadap proliferasi sel epitel payudara dan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik tersebut sehingga dapat digunakan sebagai dasar penelitian dalam menyelidiki efek ekstrak etanolik kacang panjang dalam memperbesar payudara dan dalam pembuatan bentuk sediaan yang sesuai.

METODE PENELITIAN

Bahan: buah kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) segar yang diperoleh dari daerah Curak, Bligo, Magelang pada bulan Januari 2006. Buah yang diambil adalah buah yang masih segar, tidak berpenyakit, dan sudah cukup tua. Buah dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung dan dihaluskan, kultur sel epitel payudara T47D koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* yang diperoleh dari Prof. Tatsuo Takea, NAIST, Jepang, untuk mengetahui efek proliferasi yang dihasilkan digunakan kultur sel epitel payudara T47D yang ditumbuhkan dalam media kultur RPMI berisi FBS 10% (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (Gibco), dan fungizon 0,5% (Gibco). Kultur sel ini disimpan di dalam inkubator CO₂. Uji kinetika proliferasi dilakukan dengan

menggunakan MTT. Untuk pengecatan AgNOR digunakan larutan pewarna AgNOR yaitu campuran gelatin 2% dalam HCOOH 1% dan larutan AgNO₃ 50% (1:2). Sedangkan pengamatan ekspresi reseptor estrogen dengan metode immunositokimia menggunakan H₂O₂ (Lab Vision Plus), Ultra V Block (Lab Vision), antibodi primer terhadap ERα (F-10) : sc-8002 (Santa Cruz), Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus (Lab Vision), streptavidin-enzim peroksidase (LabVision), kromogen 3,3-diaminobenzidin (DAB) (Novo Castra), hematoxilin (Merck), dan akuades.

Jalan Penelitian Ekstraksi

Serbuk buah kacang panjang sebanyak 25 gram diekstraksi dengan 200 ml etanol 96% menggunakan alat penyari Soxhlet. Ekstraksi dilakukan sampai warna sari jernih dan dilakukan selama 3 kali berturut-turut. Penyari diupayakan menggunakan *Rotary Evaporator* (RE) sehingga didapatkan ekstrak kental kacang panjang.

Pemeriksaan kandungan kimia flavonoid

Ekstrak yang diperoleh dianalisis kandungan kimianya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak etanolik kacang panjang dilarutkan metanol 96%, ditotolkan pada fase diam silika gel F 254 dan dielusi dengan fase gerak kloroform-metanol (1:9 v/v). Deteksi dilakukan di bawah sinar visibel, UV 254 nm, 365 nm, dan dengan bantuan pereaksi semprot yang sesuai untuk deteksi senyawa flavonoid, yaitu sitroborat, dilanjutkan pemanasan 100°C selama 5-10 menit. Selanjutnya dilakukan pencatatan harga hRf untuk tiap bercak yang ada.

Uji kinetika proliferasi sel (*doubling time*)

Sel dengan kepadatan $1,0 \times 10^4$ sel/sumuran didistribusikan pada 96 *well plate*. Setelah 24 jam, diberi ekstrak konsentrasi 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml dan diinkubasi dengan waktu inkubasi sesuai dengan waktu sampling (pada jam ke-0, ke-24, ke-48, and ke-72). Kemudian ditambah 10 µl MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] 5 mg/ml dalam PBS. Setelah 6 jam, ditambahkan reagen stopper SDS 10% (Sigma) dalam HCl 0,01 N (Merck). Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar, dilakukan pembacaan absorbansi sel dengan ELISA reader (λ 550 nm) sehingga diperoleh profil kinetika proliferasi sel. Analisis *doubling time* dilakukan dengan membuat kurva korelasi waktu vs jumlah sel relatif. Efek proliferasi sel ditentukan dari perbedaan pertumbuhan sel tanpa perlakuan larutan uji dan dengan perlakuan.

Pemeriksaan tingkat proliferasi dengan AgNOR

Sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 sampai 50 % konfluen dengan media kultur RPMI dan diinkubasi dengan ekstrak konsentrasi 200 µg/ml, 300 µg/ml, dan 400 µg/ml selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, medium diambil dan sel dicuci dengan PBS. Sel pada *coverslips* difiksasi dengan etanol absolut selama 30 menit kemudian diinkubasi dalam larutan pewarna AgNOR selama 45 menit pada suhu kamar di ruang gelap. *Cover slip* dicuci dengan akuades, direhidrasi dengan etanol secara bertahap, kemudian diletakkan di atas gelas objek dengan diberi *mounting fluid*. Selanjutnya preparat dibersihkan dengan *xylene*.

Ekspresi reseptor estrogen

Sel dengan kepadatan $5,0 \times 10^4$ sel/100 µL media ditanam pada *plate* 24 sampai penuh 50%-60%. Kemudian sel diinkubasi dengan larutan uji yaitu 100 µL ekstrak etanolik selama 10-15 jam. Setelah 10-15 jam, media diambil, sel dicuci PBS 500 µl, ditambah tripsin/EDTA 100 µl, dan diinkubasi 2 menit suhu 37°C. Selanjutnya sel ditambah media kultur, dihomogenisasi, diambil dengan mikropipet, dan dimasukkan *ependorf*. Kemudian sel disentrifugasi kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan diambil, ditambah media kultur, dan disuspensikan. Suspensi sel dibuat apusan pada *poly-l-lysine slide* dan dibiarkan kering pada suhu kamar. Preparat difiksasi aseton selama 10 menit dan dicuci PBS selama 5 menit. Selanjutnya preparat diinkubasi hidrogen peroksida selama 10-15 menit untuk mengurangi pengecatan yang tidak spesifik karena adanya peroksidase endogen. Preparat dicuci akuades dan PBS selama 5 menit. Kemudian preparat diinkubasi *Ultra V Block* selama 5 menit pada suhu kamar untuk mencegah pengecatan yang tidak spesifik. Selanjutnya preparat ditetesi antibodi primer anti estrogen reseptor α (pengenceran 1:100) selama 60 menit dan dicuci PBS selama 3-5 menit. Preparat diinkubasi antibodi sekunder *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus* selama 5 menit pada suhu kamar dan dicuci PBS selama 3-5 menit. Kemudian preparat diinkubasi Streptavidin Peroksidase Plus selama 5 menit pada suhu kamar dan dibilas PBS selama 3-5 menit. Selanjutnya preparat diinkubasi kromogen DAB selama 5-15 menit dan dicuci akuades. Preparat direndam hematoksilin selama 2-4 menit untuk *counterstain*, dicuci akuades, dan ditutup *coverslip*. Ekspresi protein diamati menggunakan sel yang mengekspresikan reseptor estrogen akan memberikan warna coklat atau gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan reseptor estrogen akan memberikan warna biru atau ungu.

Metode Analisis

Hasil absorbansi dikonversikan dalam prosentase kehidupan.

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

Pemeriksaan AgNOR dilakukan pada empat lapang pandang dengan menghitung rata-rata jumlah *black dot* (titik hitam) pada masing-masing sel (nilai mAgNOR) pada minimal 100 sel pada tiap lapang pandang. Analisis data kuantifikasi menggunakan analisis statistik metode *One Way ANOVA* dengan *paired t-test* taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$).

Metode imunositokimia untuk mengetahui level ekspresi reseptor estrogen dengan cara menghitung % jumlah sel yang mengekspresi protein tertentu dari keseluruhan sel (minimal 200 sel) dan dibandingkan antara perlakuan dan kontrol. Ekspresi protein positif jika sel dominan berwarna coklat atau gelap dibandingkan kontrol negatif.

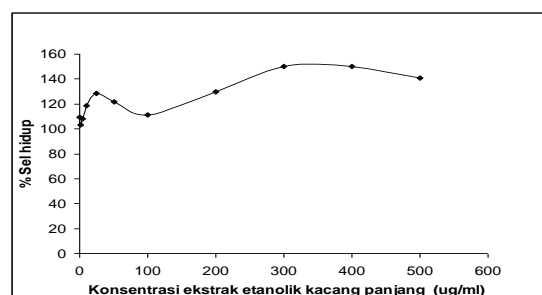
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Analisis Kandungan Kimia

Ekstraksi 5 kg kacang panjang menghasilkan ekstrak kental kacang panjang sebanyak 25,07 gram. Untuk mengetahui senyawa dalam ekstrak etanolik kacang panjang yang kemungkinan berefek proliferasi dilakukan analisis kandungan kimia flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Analisis kandungan flavonoid menunjukkan bercak kuning oranye di bawah sinar UV 366 nm setelah disemprot dengan sitroborat. Bercak tersebut kemungkinan merupakan senyawa golongan flavonoid. Sehingga analisis kandungan kimia ekstrak etanolik kacang panjang dengan KLT menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

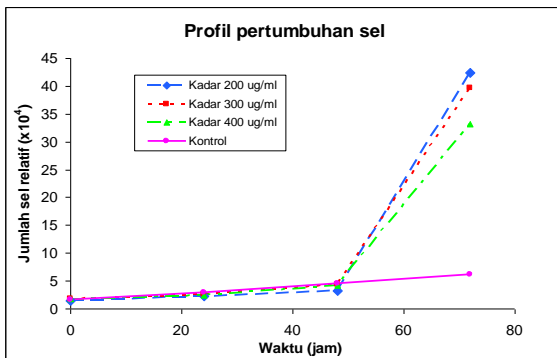
Uji Kinetika Proliferasi Sel (*Doubling Time*)

Hasil optimasi membuktikan bahwa ekstrak etanolik kacang panjang mampu memberikan efek proliferasi terhadap sel epitelial payudara T47D dengan fenomena *dose dependent* (Gambar 1).



Gambar 1—Pengaruh ekstrak dalam berbagai konsentrasi terhadap viabilitas sel

Pada uji *doubling time* digunakan konsentrasi ekstrak etanolik kacang panjang yang memberikan efek proliferasi besar, yaitu 200 µg/ml, 300 µg/ml, dan 400 µg/ml. Konsentrasi 200 µg/ml, 300 µg/ml, and 400 µg/ml meningkatkan pertumbuhan sel epitelial payudara T47D mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-72. Konsentrasi 200 µg/ml memberikan efek proliferasi optimum (Gambar 2). Parameter yang dilihat adalah kemampuan mengkonversi MTT menjadi formazan yang berwarna ungu, berbentuk jarum, melekat pada sel, dan larut dalam SDS 10% oleh enzim suksinat dehidrogenase. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan hanya dapat dilakukan oleh sel hidup. Sehingga absorbansi formazan berbanding lurus dengan viabilitas populasi sel (Mossman, 1983).

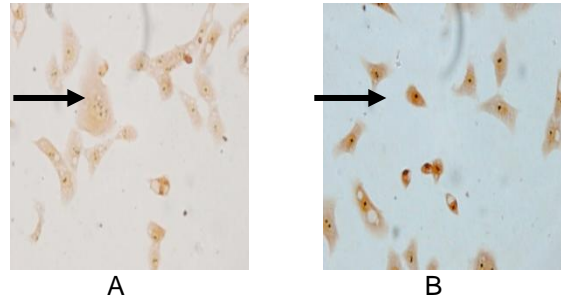


Gambar 2—Profil pertumbuhan sel (Kurva korelasi jumlah sel relatif vs waktu)

Hasil analisis *doubling time* menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak etanolik kacang panjang 200 µg/ml, 300 µg/ml, and 400 µg/ml memberikan efek proliferasi, dilihat dari nilai slope yang jauh berbeda dengan slope kontrol dan dari hasil uji t ($p=0.05$) yang berbeda signifikan dengan kontrol.

Pemeriksaan Aktivitas Proliferasi dengan Metode AgNOR

Untuk mengetahui tingkat proliferasi sel epitelial payudara T47D dilakukan pemeriksaan jumlah AgNOR yang berhubungan dengan aktivitas gen ribosomal RNA, sintesa protein, dan proliferasi sel. Dengan pewarnaan silver, AgNOR tampak sebagai titik hitam (*black dot*) karena adanya protein yang bersifat sangat argirofilik (Rizali and Auerkari, 2003) seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3—Hasil pengecatan AgNOR (perbesaran 40x10). (A) Perlakuan ekstrak 200 ug/ml, (B) Kontrol. Nampak titik hitam pada inti sel (tanda panah).

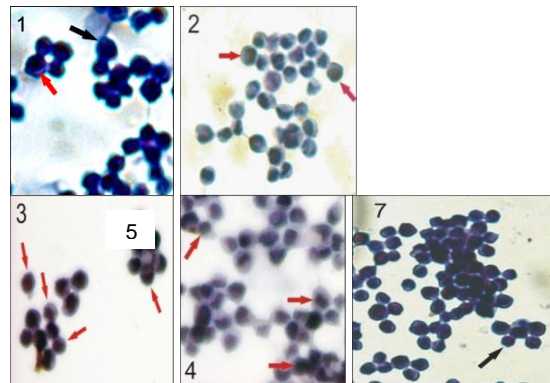
Data mAgNOR menunjukkan adanya hubungan linier antara konsentrasi ekstrak dengan angka mAgNOR. Konsentrasi 400 µg/ml memberikan angka mAgNOR optimum setelah inkubasi sel dengan ekstrak selama 24 jam (Tabel 2). Hasil analisis statistik *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Test Uji Tuckey HSD* menunjukkan bahwa angka mAgNOR antara kelompok kontrol, konsentrasi 200 µg/ml, dan 400 µg/ml berbeda signifikan.

Tabel 2—Mean AgNOR kelompok kontrol dan perlakuan ekstrak etanolik kacang panjang

Konsentrasi	Mean mAgNOR ± SD
Kontrol	1.32 ± 0,12
200 µg/ml	1.62 ± 0,31
300 µg/ml	1.66 ± 0,33
400 µg/ml	2.02 ± 0,14

Pengamatan Ekspresi Estrogen Reseptor

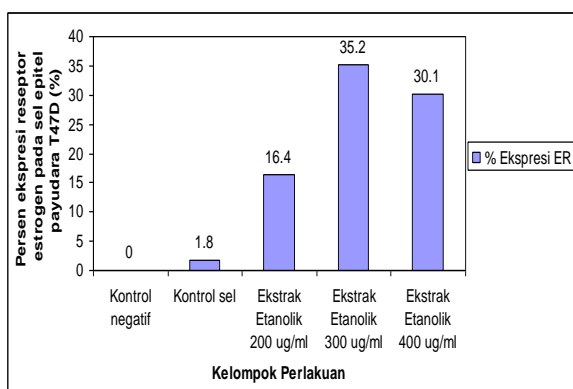
Untuk mengetahui mekanisme proliferasi sel epitelial payudara T47D dilakukan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen. Hasil pengamatan memperlihatkan adanya ekspresi reseptor estrogen positif. Hal ini ditunjukkan dari warna kecoklatan yang terdapat pada sitoplasma, inti, atau membran sel (Smith and Toft, 1993), seperti terlihat pada gambar 4.



Gambar 5—Hasil uji imunositokimia (perbesaran 40x10). (1) Kontrol, (2) Perlakuan ekstrak 200 ug/ml, (3) 300 ug/ml, (4) 400 ug/ml, (5) Kontrol negatif tanpa antibodi primer

Perlakuan ekstrak etanolik kacang panjang berpengaruh terhadap level ekspresi reseptor estrogen. Persen ekspresi reseptor estrogen pada sel epitel payudara T47D dengan perlakuan ekstrak etanolik kacang panjang mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan kontrol negatif (gambar 5). Konsentrasi ekstrak etanolik 300 µg/ml cenderung memberikan peningkatan level ekspresi reseptor estrogen maksimum. Pada konsentrasi ekstrak etanolik di bawah dan di atas 300 µg/ml peningkatan level ekspresi reseptor estrogen yang dihasilkan lebih rendah.

Kontrol sel tanpa perlakuan memberikan ekspresi reseptor estrogen positif namun tidak terlalu besar, terlihat dari persen ekspresi reseptor estrogen yang dihasilkan sebesar 1,8%. Hal ini karena sel epitel payudara T47D merupakan sel ER-positif.



Gambar 5—Profil ekspresi reseptor estrogen pada sel epitel payudara T47D

Data hasil uji ekspresi reseptor estrogen secara immunositokimia hanya bersifat semikuantitatif karena jumlah sel yang dapat diamati terlalu sedikit sehingga hasilnya tidak representatif.

Kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) mengandung senyawa flavonoid, terbukti dari hasil analisis kandungan kimia secara KLT. Kemungkinan flavonoid tersebut merupakan kuersetin, kaemferol, atau isorhamnetin. Kandungan flavonoid kemungkinan dapat memacu proliferasi sel epitel payudara T47D dan memacu peningkatan ekspresi reseptor estrogen.

Menurut Pinzone *et al.*, (2004), peningkatan ekspresi reseptor estrogen terjadi melalui beberapa cara, antara lain (a) Penghambatan DNA metil transferase 1 sehingga menyebabkan terjadinya demetilasi pada gen ER, (b) Penghambatan histon deasetilase sehingga terjadi asetilasi pada Histon H3 dan H4, (c) Aktivasi faktor transkripsi *ER Factor 1* (ERF-1)

berperan dalam transaktivasi promotor A dan membuka struktur kromatin; sedangkan *ER-B factor 1* (ERBF-1) berperan pada transkripsi dari promotor B. Kandungan flavonoid dalam ekstrak etanolik kacang panjang kemungkinan dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen pada sel epitel payudara T47D melalui beberapa mekanisme molekuler tersebut. Peningkatan level ekspresi reseptor estrogen diperkirakan dapat meningkatkan jumlah estrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen sehingga menstimulasi proliferasi sel epitel kelenjar payudara.

Kandungan flavonoid ekstrak etanolik kacang panjang diduga juga mempunyai aktivitas estrogenik dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Flavonoid dapat menghambat atau menstimulasi proliferasi sel karena mempunyai aktivitas estrogenik dan antiestrogenik secara *dose dependent* (Han *et al.*, 2002). Salah satu fitoestrogen, yaitu genistein, pada konsentrasi rendah ($<10^{-6}$ M) menstimulasi pertumbuhan sel (ER+) MCF-7 dan T47D dengan cara berikatan dengan ER, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi ($>10^{-6}$ M) menghambat pertumbuhan sel karena menurunkan ekspresi ER atau menghambat tirosin kinase (Wang *et al.*, 1996; Rice and Whitehead, 2006).

Ekstrak etanolik kacang panjang pada konsentrasi rendah (200 µg/ml) memberikan efek proliferasi maksimum terhadap sel epitel payudara T47D, sedangkan pada konsentrasi tinggi (>200 µg/ml) memberikan efek proliferasi lebih kecil. Hal ini kemungkinan karena adanya kandungan flavonoid dalam ekstrak etanolik kacang panjang yang mempunyai aktivitas estrogenik dan antiestrogenik terhadap sel epitel payudara T47D. Mekanisme yang terjadi diduga sama dengan mekanisme genistein. Namun kemungkinan mekanisme dan senyawa yang secara pasti bertanggung jawab atas mekanisme tersebut masih perlu dibuktikan kebenarannya melalui penelitian-penelitian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) konsentrasi 200 µg/ml, 300 µg/ml, dan 400 µg/ml mempunyai efek proliferasi terhadap sel epitel payudara T47D. Aktivitas proliferasi sel epitel payudara T47D melalui peningkatan ekspresi reseptor estrogen. Ekstrak etanolik kacang panjang (*Vigna cylindrica* (L.) Skeels) mengandung senyawa flavonoid yang diduga berperan dalam efek proliferasi terhadap sel epitel payudara T47D.

UCAPAN TERIMA KASIH

yang telah membantu terlaksananya penelitian DP2M DIKTI sebagai pemberi dana ini. pelaksanaan penelitian dan segenap pihak

DAFTAR ACUAN

Achadiat, C.M., 2003, Fitoestrogen untuk Wanita Menopause, *Kesepro dot Info*, diambil dari <http://situs.kesrepro.info/aging/jul/2003/ag01.htm>, diakses bulan September 2005

Cornwell, T., Cohick, W., and Raskin, I., 2004, Dietary Phytoestrogens and Health, *Phytochemistry*, 65, 995–1016

Foster, J.S., Henley, D.C., Ahamed, S., and Wimalasena, J., 2001, Estrogen and Cell Cycle Regulation in Breast Cancer, *Trend in Endocrinology and Metabolism*, 12(7), 320–327

Han, D.H., Denison, M.S., Tachibana, H., and Yamada, K., 2002, Relationship between Estrogen Receptor-Binding and Estrogenic Activities of Enviromental Estrogens and Suppression by Flavonoids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(7), 1479–1487

Handri and Rafira, 2003, Mempercantik Diri dengan Buah dan Sayur, *Pikiran Rakyat Cyber Media*, 22 Juni 2003

Hutapea, J.R., 1994, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (III), Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Jakarta.

Lattanzio, V., Arpaia, S., Cardinali, A., Di Venere, D., and Linsalata, V., 2000, Role Of Endogenous Flavonoids In Resistance Mechanism Of Vigna To Aphids, *J. Agric. Food Chem.*, 48(11), 5316–5320

Ma, Y.X., Fu, H.Z., Li, M., Sun, W., Xu, B., and Cui, J.R., 2007, An Anticancer Effect Of A New Saponin Component From *Gymnocladus Chinensis* Baillon Through Inactivation Of Nuclear Factor-KappaB, *Anticancer Drugs*, 18 (1), 41–46.

Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth & Survival: Application to Proliferation & Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Method*, 65, 65–59

Nilsson, S., Kela, S.M., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Anderson, G.R., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J., 2001, Mechanisms Of Estrogen Action, *Physiol. Rev.*, 81 (4), 1535–1565

Noorwala, M., Mohammad, F.V., and Ahmad, V.U., 1995, A New Monodesmosidic Triterpenoid Saponin From The Seeds Of *Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*, *J Nat Prod*, 58(7), 1070-4

Oh, S.M., Kim, Y.P., and Chung, K.H., 2006, Biphasic Effects Of Kaempferol On The Estrogenicity In Human Breast Cancer Cells, *Arch Pharm Res*, 29 (5), 354–62

Pinzone, J.J., Stevenson, H., Strobl, J.S., and Berg, P.E., 2004, Molecular and Cellular Determinants of Estrogen Receptor á Expression, *Mol. Cell. Biol.*, 24(11), 4605–4612

Rizali, E., and Auerkari, 2003, *Teknik Pewarnaan Silver (AgNOR) sebagai Salah Satu Cara Menentukan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor and Apoptosis*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia, Jakarta

Wagner, H., Bladt, S., and Zgainski, E.M., 1984, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer Verlag, B

Wang, T.T.Y., Sathyamoorthy, N., and Phang, J.M., 1996, Molecular Effects Of Genistein On Estrogen Receptor Mediate Pathways, *Carcinogenesis*, **17** (2), 271–275

Wong, Y.S., and Chang, Q., 2004, Identification Of Flavonoids In Hakmeitau Beans (*Vigna Sinensis*) By High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry (LC-ESI/MS), *J. Agric. Food Chem.*, **52** (22), 6694–6699