

**PENINGKATAN EFEK SITOTOKSIK *DOXORUBICIN* OLEH NARINGENIN  
MELALUI PEMACUAN APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**  
*“The Cytotoxic Effect Increment of Doxorubicin by Naringenin Through  
Apoptosis Induction of MCF-7 Cancer Cell Lines”*

Aditya Fitriyanti, Ratna Asmah Susidarti dan Edy Meiyanto<sup>1)</sup>  
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

**Abstract**

*Chemotherapeutic agent doxorubicin has a lot of side effects and resistance problem. Therefore, it is important to develop combination treatment of doxorubicin with natural product (co-chemotherapy) such as naringenin. Naringenin has been proven to have cytotoxic activity against several cancer cell lines. Naringenin also increase the sensitivity of MCF-7 breast cancer cell towards doxorubicin. The aim of this research is to examine the synergistic effect of naringenin on the cytotoxic activity of doxorubicin through apoptosis induction of MCF-7 cancer cell lines.*

*The cytotoxic assay of naringenin and doxorubicin were carried out by MTT method using naringenin concentrations of 100-1250  $\mu$ M and doxorubicin concentrations of 50-800 nM to determine the  $IC_{50}$ . Based on the  $IC_{50}$  values, the cytotoxic assay of their combination were carried out by MTT method using concentrations of  $1/8$ ,  $1/4$ ,  $3/8$  and  $1/2$   $IC_{50}$  values. Apoptosis assay of their best combination concentrations were done using double staining method.*

*Naringenin and doxorubicin showed cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cell with  $IC_{50}$  of 520  $\mu$ M and 467 nM, respectively. Based on CI values, almost all concentration combination of naringenin and doxorubicin showed synergistic effect (CI 0,1-0,9). This synergistic effect is due to the induction of apoptosis, showed by the increasing number of orange fluorescence cells in double staining method. Based on this results, naringenin was potential to be developed as co-chemotherapeutic agent. However, the molecular mechanism need to be explored further.*

**Keywords:** Naringenin, Co-chemotherapy, Apoptosis, MCF-7 cell lines

Naskah diterima tanggal 11 Januari 2010, disetujui untuk dimuat 29 April 2010

Alamat korespondensi:

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Sekip Utara, Yogyakarta 55281,

Telp/Fax: (0274) 543120,

E-mail: meiyant\_e@ugm.ac.id

**PENDAHULUAN**

Sel kanker, termasuk sel kanker payudara, mampu menghindari mekanisme apoptosis (kematian sel terprogram) sehingga pertumbuhan sel kanker tidak terkontrol. Salah satu agen kemoterapi yang digunakan sebagai *first line* terapi kanker payudara adalah *doxorubicin*. Namun, *doxorubicin* dapat menimbulkan efek samping dan tidak spesifik terhadap sel kanker sehingga merusak sel tubuh normal. Selain itu, *doxorubicin* cenderung menimbulkan resistensi sel kanker payudara terhadap obat sehingga mengakibatkan kegagalan terapi kanker (1). Resistensi sel kanker akibat kemoterapi dapat terjadi dengan peningkatan ekspresi Bcl-2 dan pompa *efflux P-glycoprotein* (P-gp) (2, 3). Oleh karena itu, perlu dilakukan kombinasi agen kemoterapi dengan agen kemopreventif (ko-kemoterapi) untuk meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara melalui pemacuan apoptosis.

Salah satu agen kemopreventif yang telah terbukti efeknya adalah naringenin, suatu senyawa golongan flavanon yang terkandung dalam buah jeruk (*Citrus reticulata* dan *Citrus aurantium*) (4). Mekanisme sitotoksik naringenin pada sel kanker lambung (KATOIII and MKN-7) dan sel kanker liver (HepG2, Hep3B, Huh7) dalam menginduksi apoptosis melalui jalur independen p53 (5). Naringenin juga mampu menginduksi apoptosis

melalui aktivasi induksi NF- $\kappa$ B pada sel HL-60 dan mengaktivasi p38 MAPK dan JNK1/2 (6, 7). Kombinasi naringenin dengan agen kemoterapi *doxorubicin*, *daunomicin*, dan *mitoxantrone* menunjukkan bahwa naringenin dapat mengembalikan sensitivitas sel kanker payudara MCF-7 dengan menghambat aktivitas *breast cancer resistance protein* (BCRP), pompa *efflux P-gp*, atau *multidrug resistance associated protein* (MRP) (8, 9, 10). Naringenin dapat mengurangi efek samping kardiotoxik *doxorubicin* pada tikus (11).

Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan potensi naringenin sebagai agen kemopreventif. Namun, penelitian naringenin sebagai agen ko-kemoterapi *doxorubicin* melalui pemacuan apoptosis sel kanker payudara MCF-7 belum pernah dilakukan. Padahal pemacuan apoptosis juga merupakan target pengobatan kanker. Oleh karena itu, pada penelitian ini ingin diketahui pengaruh naringenin tunggal maupun kombinasinya dengan *doxorubicin* terhadap apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

**METODE**

**Bahan**

Naringenin (Nar) diperoleh dari Sigma Aldrich. *Doxorubicin* Ebewe (Dox) diperoleh dari PT. Ferron Par Pharmaceutical. Nar dan Dox dilarutkan dalam *Dimethyl*



*Sulfoxide* (DMSO) (Sigma Aldrich). Sel kanker payudara MCF-7 merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi, UGM. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v), penisillin-streptomisin 1% (v/v). Sel dipanen dari *culture disk/flask* dengan tripsin-EDTA 0,025% (Gibco). Reagen MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] 5 mg/ml dalam *phosphat buffer saline* (PBS). Reagen *stopper* mengandung sodium dodesil sulfat 10% dalam 0,1 N HCl. Reagen etidium bromida-akridin oranye (EA) terdiri dari 0,1% etidium bromida dan 0,03% akridin oranye dalam 2% etanol 95%, ditambah akuades hingga 100%. Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti berderajat pro analisis.

**Uji sitotoksik dan ko-kemoterapi menggunakan metode MTT**

Sel MCF-7 dengan konsentrasi  $5 \times 10^3$  sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Keesokan harinya media diambil, dicuci PBS, kemudian ditambahkan 100 µl sampel (naringenin 100-1250 µM, *doxorubicin* 50-800 nM, dan kombinasi keduanya), inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang dan dicuci PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 µl MTT 5 mg/ml, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, MTT dibuang, dan ditambahkan larutan *stopper* untuk melarutkan kristal formazan. Sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, *plate* digoyang horizontal (*shaker*) selama 10 menit kemudian dibaca dengan *ELISA reader* pada  $\lambda$  595 nm.

**Pengamatan apoptosis menggunakan metode double staining (EA)**

Sel dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  sel/sumuran ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 dan diinkubasi selama 24 jam. Sel diberi perlakuan konsentrasi kombinasi naringenin dan *doxorubicin* dengan nilai CI paling kecil, dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, medium diambil dan sel dicuci PBS. *Cover slip* yang memuat sel diangkat, diletakkan diatas gelas objek dan ditambahkan 10 µl etidium bromida-akridin oranye. Segera diamati di bawah mikroskop flouresen.

**Analisis hasil**

**Uji sitotoksik dan ko-kemoterapi**

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup, dengan rumus (1).

$$\%H = \frac{AP - AM}{AK - AM} \times 100 \dots\dots (1)$$

Keterangan:

- %H = Persen Hidup
- AP = Absorbansi Sel dengan Perlakuan
- AK = Absorbansi Sel Kontrol
- AM = Absorbansi Kontrol Media

Data persen viabilitas sel digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  dengan regresi linier antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel.

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh masing-masing, ditetapkan rasio konsentrasi kombinasi naringenin dan *doxorubicin* (Tabel I).

Potensi aplikasi dalam terapi kombinasi dianalisis dengan menggunakan metode indeks kombinasi (*combinatorial index method/CI*) berdasarkan Chou (12). CI ditentukan dengan rumus (2).

$$CI = (D_1)/(Dx_1) + (D_2)/(Dx_2) \dots\dots (2)$$

$Dx_1$  dan  $Dx_2$  adalah konsentrasi senyawa tunggal yang diperoleh dari intrapolasi persen viabilitas sel yang disebabkan oleh perlakuan kombinasi (x) pada persamaan regresi yang digunakan untuk menentukan  $IC_{50}$ .  $D_1$  dan  $D_2$  adalah konsentrasi masing-masing senyawa uji yang digunakan untuk uji kombinasi. Angka CI yang diperoleh kemudian diinterpretasikan (Tabel II).

**Pengamatan apoptosis**

Sel hidup akan berfluorosensi hijau terang (dengan akridin oranye), sel yang mengalami apoptosis tahap awal akan mengalami kondensasi kromatin dan masih berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis pada tahap akhir akan terpecah-pecah menjadi bagian yang lebih kecil dan berwarna oranye (dengan etidium bromida).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Aktivitas sitotoksik naringenin telah terbukti pada beberapa sel kanker (5). Penelitian ini memperkuat bukti sitotoksitas naringenin. Hasil uji sitotoksik tunggal menunjukkan bahwa naringenin tunggal memberikan efek sitotoksik dengan nilai  $IC_{50}$  520 µM (Gambar 1). Efek sitotoksik naringenin ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan senyawa flavonoid lain, seperti genistein, kuersetin, dan baicalein (13). Walaupun mempunyai efek sitotoksik yang rendah, tidak menutup kemungkinan bahwa naringenin dapat digunakan sebagai agen kombinasi dengan *doxorubicin*.

Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang resisten terhadap agen kemoterapi *doxorubicin*, terlihat

**Tabel I. Konsentrasi kombinasi naringenin dan *doxorubicin* yang digunakan dalam penelitian**

<i>Doxorubicin</i> ( $IC_{50}$ )	Naringenin ( $IC_{50}$ )			
	$1/8$	$1/4$	$3/8$	$1/2$
$1/8$	$1/8 : 1/8$	$1/8 : 1/4$	$1/8 : 3/8$	$1/8 : 1/2$
$1/4$	$1/4 : 1/18$	$1/4 : 1/4$	$1/4 : 3/8$	$1/4 : 1/2$
$3/8$	$3/8 : 1/8$	$3/8 : 1/4$	$3/8 : 3/8$	$3/8 : 1/2$
$1/2$	$1/2 : 1/8$	$1/2 : 1/4$	$1/2 : 1/3$	$1/2 : 1/2$



Tabel II. Interpretasi nilai indeks kombinasi (12)

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,9	efek sinergis ringan – sedang
0,9 – 1,1	mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	efek antagonis ringan – sedang
1,45 – 3,3	efek antagonis
> 3,3	efek antagonis kuat – sangat kuat

dari nilai  $IC_{50}$  *doxorubicin* yang relatif tinggi pada sel MCF-7 yaitu 467 nM, jika dibandingkan nilai  $IC_{50}$  *doxorubicin* pada sel kanker sensitif agen kemoterapi (T47D) yaitu sebesar 43 nM (14). Hal ini disebabkan karena sel MCF-7 mengalami overekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 dan pompa *efflux P-glycoprotein* (P-gp), serta adanya peningkatan level Akt terfosforilasi (2, 3, 15). Salah satu strategi untuk meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 adalah dengan mengkombinasikan *doxorubicin* dengan naringenin. Naringenin ini diharapkan dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik *doxorubicin*.

Hasil perhitungan indeks kombinasi (CI) menunjukkan bahwa hampir semua perlakuan kombinasi naringenin dan *doxorubicin* pada sel MCF-7 memberikan efek sinergis (CI 0,1-0,9) (Tabel III, Gambar 2).

Hasil uji sitotoksik naringenin tunggal maupun kombinasi sesuai hasil uji apoptosis dengan metode *double staining*. Kombinasi naringenin dengan *doxorubicin* dapat meningkatkan insidensi terjadinya apoptosis, dibandingkan masing-masing perlakuan tunggalnya (Gambar 3).

Efek apoptosis tersebut terlihat dari adanya beberapa sel berfluorosensi oranye yang menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran sel. Beberapa sel mulai mengalami fragmentasi inti sel dan membentuk badan-badan apoptosis.

Induksi apoptosis pada sel MCF-7 oleh naringenin, *doxorubicin*, dan kombinasinya, sangat menarik untuk ditelusuri mekanisme molekulernya.

Tabel III. Nilai indeks kombinasi naringenin dengan *doxorubicin* pada sel MCF-7

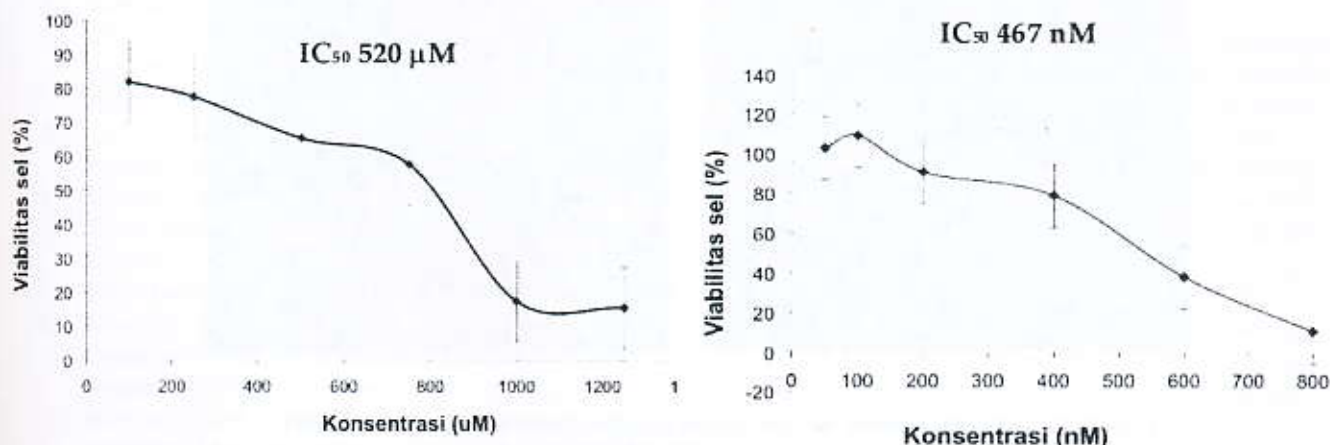
Konsentrasi naringenin ( $\mu$ M)	Konsentrasi <i>doxorubicin</i> (nM)			
	50	100	150	200
63	0.80	1.18	0.38	0.12
125	0.96	0.79	0.18	0.26
188	0.79	0.75	0.14	0.14
250	1.09	0.78	0.15	0.17

Mekanisme apoptosis pada sel MCF-7 dapat terjadi melalui jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik.

Mekanisme apoptosis yang terjadi dapat dikorelasikan dengan ekspresi beberapa protein regulator, seperti p53 (16). MCF-7 adalah salah satu jenis sel dengan *wildtype* p53 (17, 18), sehingga kemungkinan mekanisme apoptosisnya terjadi secara *p53-dependent*. *Doxorubicin* dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dengan mengaktifkan p53 yang akan menginduksi ekspresi protein pro-apoptosis Bax dan menghambat ekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 (19). Sedangkan mekanisme induksi apoptosis naringenin pada sel kanker lambung (KATOIII and MKN-7) dan sel kanker liver (HepG2, Hep3B, Huh7) melalui jalur independen p53 (4). Namun, pada penelitian ini belum dapat diketahui pengaruh naringenin terhadap protein p53. Oleh karena itu, kemungkinan naringenin dapat meningkatkan efek apoptosis *doxorubicin* melalui jalur *p53-dependent* maupun *p53-independent*.

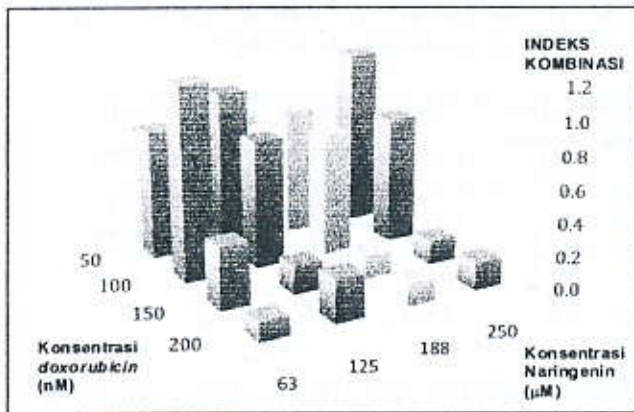
Peningkatan efek sitotoksik ini kemungkinan juga terjadi melalui penghambatan ekspresi Bcl-2 karena MCF-7 mengalami over-ekspresi Bcl-2 (18) dan peningkatan ekspresi Bax yang akan memacu pelepasan sitokrom C yang akan mengaktifkan jalur caspase (20, 21). Naringenin kemungkinan dapat mengaktifkan caspase-9, caspase-7, dan caspase-6 (20, 21, 22). Caspase-9 akan mengaktifkan caspase 7/6 yang akan memacu degradasi sel (18).

Kemungkinan mekanisme lain yang memperantarai efek pemacuan apoptosis adalah



Gambar 1. Efek perlakuan Naringenin (A) dan *Doxorubicin* (B) terhadap pertumbuhan sel MCF-7. Nilai  $IC_{50}$  didapat dari perhitungan regresi linier log kadar vs % sel hidup dengan  $p < 0,05$ .





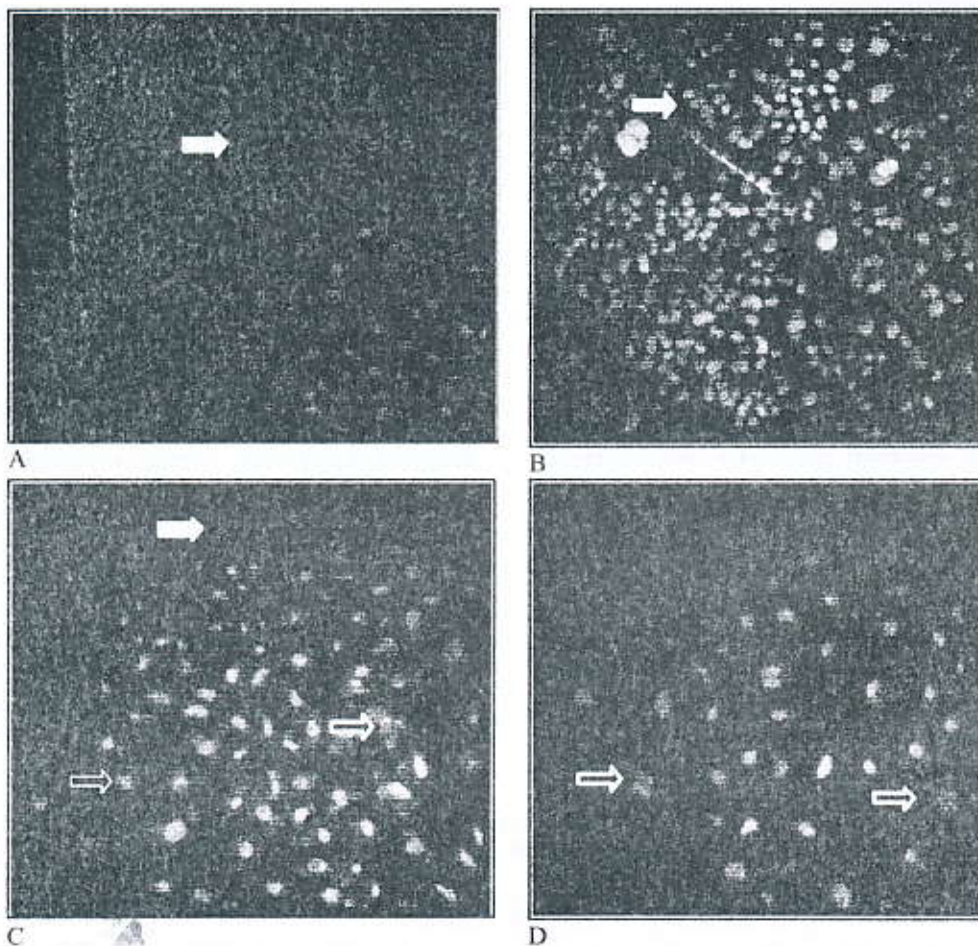
Gambar 2. Efek perlakuan kombinasi naringenin dan doxorubicin terhadap penghambatan pertumbuhan sel MCF-7. Grafik menunjukkan nilai indeks kombinasi perlakuan kombinasi naringenin dan doxorubicin ( $P < 0,05$ ).

penghambatan jalur *survival* sel dengan menghambat protein kinase, salah satunya PI3K. Aktivasi jalur PI3K/Akt oleh doxorubicin terbukti dapat menginaktivasi Bad sehingga meningkatkan resistensi sel MCF-7 terhadap

apoptosis (5). Adanya naringenin pada perlakuan kombinasi naringenin dan doxorubicin kemungkinan dapat menghambat jalur ini melalui inaktivasi PI3K/Akt (20).

Peningkatan efek sitotoksik yang terjadi secara signifikan (sinergisme) setelah perlakuan kombinasi naringenin dan doxorubicin ini dapat terjadi melalui penghambatan protein *multidrug resistance* (MDR) oleh naringenin (8, 9, 10). Penghambatan protein MDR ini menyebabkan doxorubicin yang masuk ke dalam sel semakin banyak sehingga dapat secara efektif meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin melalui pemacuan apoptosis. Kedua mekanisme yang berbeda tersebut, yaitu penghambatan MDR dan pemacuan apoptosis akan saling sinergis sehingga memberikan efek sitotoksik yang jauh lebih besar dibandingkan perlakuan tunggalnya masing-masing.

Keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa naringenin mampu menginduksi apoptosis serta menunjukkan sinergisme dengan agen kemoterapi doxorubicin pada kanker payudara MCF-7. Oleh karena itu, naringenin cukup berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen pendamping kemoterapi. Namun mekanisme molekuler yang memperantarai naringenin



Gambar 3. Efek naringenin dan doxorubicin dalam memacu apoptosis sel MCF-7. (A) Kontrol sel, (B) Perlakuan naringenin 63 µM, (C) Perlakuan Doxorubicin 200 nM, (D) Kombinasi naringenin 63 µM dan doxorubicin 200 nM. Keterangan: ⇨ sel hidup berfluoresensi hijau; ⇨ sel apoptosis berfluoresensi oranye, terlihat adanya fragmentasi inti sel



dalam memacu apoptosis sel MCF-7 masih perlu ditelusuri lebih lanjut.

Kombinasi naringenin dan *doxorubicin* ini memberikan keuntungan pada aplikasi klinik, yang berbeda dengan kombinasi kemoterapi lain. Toksisitas naringenin yang rendah menunjukkan bahwa naringenin relatif aman untuk digunakan dalam terapi kanker tanpa menimbulkan efek toksik terhadap sel normal. Hal ini diperkuat dengan penelitian bahwa naringenin tidak memberikan efek toksik yang signifikan pada tikus dengan nilai LD50 sebesar 15 g/kg (5). Selain itu, adanya naringenin dalam terapi kombinasi ini akan menurunkan dosis *doxorubicin* yang digunakan. Penurunan dosis *doxorubicin* ini tentu saja akan menurunkan efek samping penggunaan *doxorubicin*.

#### KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi naringenin dan *doxorubicin* memberikan efek sinergis. Efek sinergisme tersebut terjadi karena naringenin dapat meningkatkan efek apoptosis *doxorubicin*. Oleh karena itu, kombinasi naringenin dan *doxorubicin* dapat digunakan untuk terapi kanker payudara yang resisten terhadap *doxorubicin*. Namun, masih diperlukan penelusuran mekanisme molekuler lebih lanjut untuk dapat dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Program DIPA Universitas Gadjah Mada yang mendanai penelitian ini melalui program penelitian Tim Hibah Pascasarjana Multitahun tahun 2009.

#### DAFTAR RUJUKAN

- Smith L, Watson MB, O'Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L. 2006. The analysis of *doxorubicin* resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol. Cancer Ther.* 5 (8), 2115–20.
- Davis JM, Navolanic PM, Weinstein-Opppenheimer CR, Steelman LS, Wei H, Konopleva M, Blagosklonny MV, McCubrey JA. 2003. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance. *Clin. Canc. Res.* 9, 1161-1170.
- Valeria P, Barrera-Rodr-gue R. 2005. *Cancer Cell Int.* Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids. 5 (20), Summary.
- De Leo F, and Del Bosco SF. 2005. Citrus Flavonoids as Bioactive Compounds: Role, Bioavailability, Socio-Economic Impact and Biotechnological Approach For Their Modification, *9th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later*, Ravello (Italy).
- Kanno S, Tomizawa A, Hiura A, Osanai A, Shouji A, Ujibe A, Ohtake AT, Kimura K, Ishikawa M. 2005. Inhibitory Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (3), 527—530.
- Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koizumi K, Ujibe M, Ishikawa M. 2006. Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- $\kappa$ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol. Lett.* 166, 131–139.
- Gopalakrishnan A, Xu CJ, Nair SS, Chen C, Hebbar V, Kong AN. 2006. Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells. *Arch. Pharmacol. Res.* 29, 633–644.
- Chung SY, Sung MK, Kim NH, Jang JO, Go EJ, Lee HJ. 2005. Inhibition of P-Glycoprotein by Natural Products in Human Breast Cancer Cells. *Arch. Pharm. Res.* 28 (7), 823-828.
- Zhang S, Yang X, Morris ME. 2004. Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Mol. Pharmacol.* 65, 1208–1216.
- Zhang FY, Du GJ, Zhang L, Zhang CL, Lu WL, Liang W. 2009. Naringenin Enhances the Anti-Tumor Effect of *Doxorubicin* Through Selectively Inhibiting the Activity of Multidrug Resistance-Associated Proteins but not P-glycoprotein. *Pharm. Res.* 26 (4), 914-925.
- Arafa HM, Abd-ellah MF, Hafez HF. 2005. Abatement by Naringenin of Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 17 (4), 291-300.
- Reynolds CP, Maurer BJ. 2005. Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models. *Methods Mol. Med.* 110, 173-83.
- So FV, Guthrie AF, Chamber AF, and Carroll KK. 1997. Inhibition of Proliferation of Estrogen Receptor-Positive MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Flavonoids In The Presence and Absence of Excess Estrogen. *Cancer Lett.* 112, 127-133.
- Jenie RI, Meiyanto E. 2006. Efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. *Indon. J. Pharm (MFI)*, 17 (1), 50-55.
- Li X, Lu Y, Liang K, Liu B, Fan Z. 2005. Differential Responses to *Doxorubicin*-Induced Phosphorylation and Activation of Akt in Human Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res.* 7 (5), R589-R597.
- Gosslau A, Chen M, Ho CT, Chen KY. 2005. A methoxy derivative of resveratrol analogue selectively induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway in transformed fibroblast. *Br. J. Cancer* 92, 513-521.
- Onuki R, Kawasaki H, Baba T, Taira K. 2003. Analysis of A Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence of A Caspase-3-Dependent Pathway. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13 (2), 75-82.
- Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Exp. Biol. Med.* 228, 995–1003.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and

- Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185-228.
20. Park JH, Jin CY, Lee BK, Kim GY, Choi YH, Jeonge YK. 2008. Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3684-3690.
  21. Jin CY, Park C, Lee JH, Chung KT, Kwon TK, Kim GY, Choi BT, Choi YH. 2009. Naringenin-induced apoptosis is attenuated by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human leukemia U937 cells. *Toxicology in Vitro.* 23, 259-265.
  22. Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G, Kofler R, Csordas A, Greil R. 2001. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J.* 15 (9), 1613-1615.