

PENINGKATAN AKTIVITAS SITOTOKSIK DOXORUBISIN TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7 MENGGUNAKAN EKSTRAK ETANOLIK DAUN AWAR-AWAR(*Ficus septica* Burm. F)

M Fithrul Mubarak ,Dewi Arum, Ainun Wulandari, R.I Jenie*,E.P. Septisetyani, Edy Meiyanto

*CCRC-Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Intisari

Kombinasi agen kemoterapi dengan agen kemopreventif merupakan alternatif upaya untuk meningkatkan daya sitotoksik suatu agen kemoterapi terhadap sel kanker. Ekstrak etanolik daun awar-awar (EA) menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF7 dengan IC50 6 µg/ml dan dapat menginduksi apoptosis. Pengembangan alternatif pengobatan kombinasi agen kemoterapi dengan senyawa yang berasal dari alam diharapkan mampu menurunkan resistensi sel kanker sehingga meningkatkan aktivitas sitotoksik agen kemoterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sinergis kombinasi ekstrak etanolik daun awar-awar (EA) dengan doxorubisin (Dox) terhadap sel kanker payudara MCF7.

Uji sitotoksik kombinasi EA-DOX dilakukan dengan metode MTT. Data absorbansi dikonversi menjadi persen kehidupan sel dan dianalisis untuk mendapatkan indeks kombinasi (CI). Docking senyawa fenantroindolisidin dengan Raf-1 dilakukan dengan program MOE (Molecular Operating environment) untuk mengetahui potensi penghambatan terhadap raf-1. Kombinasi EA-Dox menghasilkan efek sinergis pada kombinasi kadar optimum yaitu kombinasi Dox 150, 200nM dengan EA 0,75 µg/ml memiliki efek sinergis; Dox 150,200 nM dengan EA 1,5 µg/ml memiliki efek sinergis sedang. Score interaksi ligan tilopirin dengan Raf-1 menghasilkan energi terendah sebesar -10,5981, sedangkan ATP dengan Raf-1 sebesar -12,9404 yang menunjukkan adanya kemungkinan penghambatan berkompetisi dengan ATP untuk berinteraksi dengan Raf-1 sehingga menghambat jalur terekspresinya pgg.

Penelitian ini membuktikan bahwa penggunaan EA dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik Dox pada sel MCF7 dengan penghambatan resistensi sel kanker melalui interaksi fenantroindolisidin dengan Raf-1. Oleh karena itu, Ekstrak awar-awar berpotensi sebagai agen kokemoterapi dengan Dox pada kanker payudara.

Kata kunci : *Ficus Septica*, doxorubisin, Sel MCF7, efek sinergis

Pendahuluan

Kanker payudara termasuk jenis kanker yang paling sering diderita kaum wanita. Dari semua kasus kanker pada wanita di Amerika Serikat, kanker payudara menduduki peringkat pertama (32%) dan kematian karena kanker jenis ini mencapai 18% (King, 2000). Di Indonesia, dari sepuluh jenis kanker primer yang diderita wanita,

kasus kanker payudara mencapai 17,77% setelah kanker rahim 28,66% (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Oleh karena itu, pengembangan dan penemuan pengobatan kanker payudara perlu terus diupayakan.

Pengobatan kanker dengan cara kemoterapi merupakan pilihan potensial untuk penanganan kanker pada stadium lanjut diantara pilihan pengobatan kanker

yang lain, meliputi pembedahan, radioterapi, terapi biologik (Dolinsky, 2002). Kemoterapi merupakan langkah pengobatan dengan menggunakan senyawa kimia yang memiliki aktivitas sitotoksik dan bekerja secara langsung pada sel kanker. Akan tetapi, pengobatan kanker menggunakan agen kemoterapi cenderung menimbulkan resistensi sel kanker yang mengakibatkan sebagian besar kegagalan pengobatan kanker (Staerk dkk., 2002). Kombinasi agen kemoterapi dengan agen kemopreventif merupakan alternatif upaya untuk meningkatkan daya sitotoksik suatu agen kemoterapi terhadap sel kanker.

Tanaman Awar-awar (*Ficus septica* Burm. F) mengandung alkaloid fenantroindolisidin yang berpotensi sebagai agen kemopreventif (Staerk dkk.,2002). Aktivitas sitotoksik komponen fenantroindolisidin menunjukkan nilai poten yang tinggi pada *cell lines carcinoma* KB-VI (*multidrug resistance cell*) dan KB-3-1(*sensitive cell*). Salah satu komponen fenantroindolisidin berupa 6-*O-desmethylantofine* dari *Tylophora tanakae* mempunyai IC_{50} 7 ± 3 nM untuk sel KB-3-1 dan IC_{50} 10 ± 4 nM untuk sel KB-VI (Staerk dkk., 2002). Dalam ekstrak metanol daun *F. septica* yang terbukti mengandung alkaloid fenantroindolisidin mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker nasofaring HONE-1 dan sel kanker lambung NUGC (Damu, 2005). Ekstrak etanolik daun *F. septica* terbukti memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 58,58 μ g/ml (Nurchaya, 2007). Dengan bukti – bukti ilmiah diatas, penelitian mengenai kombinasi ekstrak etanolik daun *F. septica* dengan doxorubisin penting dilakukan untuk membuktikan peningkatan aktivitas sitotoksik doxorubisin oleh alkaloid fenantroindolisidin yang terkandung pada daun *F. septica* pada sel kanker payudara MCF-7. Sel MCF-7 merupakan sel yang sesuai sebagai model sel kanker payudara yang mudah mengalami resistensi (Doyle, 2000).

Resistensi obat dapat terjadi melalui mekanisme pengeluaran obat oleh protein

pompa pada membran sel, inaktivasi obat, kegagalan inisiasi apoptosis dan mutasi target obat (Davis *et al.*, 2003, Notarbartolo *et al.*, 2005). Penelitian Davis *et al* (2003) menunjukkan bahwa aktivasi Raf-1 (terfosforilasi) yang berlebihan berperan dalam timbulnya resistensi doxorubisin. Raf-1 menginduksi gen MDR-1 untuk mengekspresikan p-glikoprotein yang merupakan suatu transporter membran plasma yang memompa keluar doxorubisin dari sel sebagai penyebab *multidrug resistance* (MDR) (Kitagawa, 2005). Melalui studi *docking* molekuler akan diteliti afinitas dan interaksi fenantroindolisidin dengan Raf-1 sebagai langkah awal penelusuran mekanisme peningkatan sitotoksik doxorubisin secara komputasi.

Metodologi

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanolik awar-awar yang berasal dari daun awar-awar(*Ficus septica* Burm. F), diambil dari daerah Kalasan,Sleman,Yogyakarta dan telah dideterminasi di laboratorium Farmakognosi bagian Biologi Farmasi fakultas Farmasi UGM. Daun dikeringkan secara tidak langsung menggunakan sinar matahari yang ditutup bagian atasnya menggunakan kain hitam, setelah kering diserbuk. Sebanyak 400 gram serbuk dimaserasi dengan penyari etanol 70% selama 5 hari. Fraksi etanol yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Sel uji yang digunakan adalah Sel kanker payudara MCF-7 cell line (ATCC) dari Laboratorium Kedokteran Tropis, Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM.

Alat Penelitian

Alat-alat gelas, flakon, timbangan gram (Lion Star), timbangan analitik (Shimazu, type LS-6DT), Rotary Vacuum Evaporator (Heidolph WB 2000), aluminium foil (Klin Pak), tisu gulung (Tessa), tisu makan (Tessa), kain kasa (HK), plastik seal, sarung tangan (Medi Glove M dan B. Braun S), masker (One Med), inkubator thermostat (Heraccus), Laminar Air Flow Hood (LAF),

bunsen, mikroskop (Olympus), tissue culture flask (Nunclon), tabung konikal (Nunclon), botol Durant (Nunclon), 96 well- plate (Iwaki), mikropipet (Gilson), yellow tip, blue tip, hemocytometer (Nebaur), cell counter, Microplate reader (Anthos 2001, COM1), Shaker, autoklaf, filter Whatman 0,2 μm (Sartorius), vortex, eppendorf tube, kamera digital (Canon Power Shoot S 40, 4,0 mega pixels)

Bahan Kimia

Etanol 70 % (Merck), Sel MCF-7 (Fakultas Kedokteran UGM), DMEM yang mengandung Foetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v (Gibco), DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma), trypsin-EDTA (Gibco), aquadest (Asia Lab), PBS, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma),

Uji Komputasi dengan Metode Docking

Sebelum *docking* harus disiapkan dulu struktur senyawa yang akan di *docking* (ligan) dengan energi yang terendah dan protein targetnya. Pertama, gambar struktur ligan pada layar MOE. Setelah gambar terbentuk lakukan minimalisasi energi. Minimalisasi energi ini bertujuan untuk mencari struktur yang paling stabil. Kestabilan ini ditunjukkan oleh energi yang paling kecil. Setelah struktur ligan siap, kemudian kita siapkan reseptor atau protein target. Pertama, *download* reseptor yang diinginkan di web *Protein Data Bank* (www.rcsb.org). Setelah di-*download* kemudian, tampilkan pada layar MOE. Kemudian struktur reseptor tersebut di kalkulasi muatan parsialnya. Kemudian pilih muatan parsial yang terbesar. Setelah itu siapkan *binding site*-nya. Setelah siap, protein target atau reseptor tersebut dapat di-*docking*-kan dengan ligan.

Setelah ligan dan protein target siap, tampilkan dalam satu layar. Kemudian didockingkan. Setelah di-*docking*-kan akan muncul data *docking* yang berupa skor. Skor ini menggambarkan kestabilan ligan yang berikatan dengan protein target. Semakin kecil nilai skor, maka ikatan antara ligan dan protein target makin stabil. Berarti efek yang ditimbulkan ligan tersebut terhadap protein

target lebih besar. Kemudian langkah selanjutnya adalah mengevaluasi interaksi ikatan antara ligan dengan protein target. Ikatan yang dapat terjadi antara lain ikatan hidrofobik, ikatan hydrogen, *Van der Waals*, dan sebagainya). Dari hasil tersebut diperoleh gambar secara dua dimensi dan tiga dimensi interaksi berupa ikatan antara ligan dengan protein targetnya.

Uji sitotoksitas ekstrak awar-awar dan doxorubisin

Sel dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasikan selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel disumuran. Keesokannya media diambil kemudian ditambah kan 100 μl media kultur yang mengandung DMSO dan ekstrak dengan seri tertentu atau doxorubisin pada seri tertentu, inkubasi selama 24 jam. Untuk control sel hanya ditambah media kultur saja. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan PBS 100 μl . Kemudian dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μl media kultur DMEM yang mengandung MTT 0.5 mg/ml (pengenceran 10 x stok MTT 5mg/ml). Kemudian inkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C dan aliran CO₂ 5%. Amati kondisi sel dengan mikroskop, sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam kemudian setiap sumuran ditambah 100 μl SDS, inkubasi semalam dalam suasana gelap, dibungkus aluminium foil. Kemudian di-shaker 3 menit dan dibaca absorbansinya dengan ELISA panjang gelombang 550 nm.

Uji ko-kemoterapi menggunakan metode MTT

Sel dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasikan selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel disumuran. Keesokannya media diambil kemudian ditambah kan 100 μl media kultur yang mengandung DMSO saja (control) atau sampel (baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi), inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang

mengandung sampel dibuang, dicuci dengan PBS 100 μ l. Kemudian dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ l media kultur DMEM yang mengandung MTT 0.5 mg/ml (pengenceran 10 x stok MTT 5mg/ml). Kemudian inkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C dan aliran CO2 5%. Amati kondisi sel dengan mikroskop, sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam kemudian setiap sumuran ditambah 100 μ l SDS, inkubasi semalam dalam suasana gelap, dibungkus aluminium foil. Kemudian dishaker 3 menit dan dibaca absorbansinya dengan ELISA panjang gelombang 550 nm.

Analisis Data

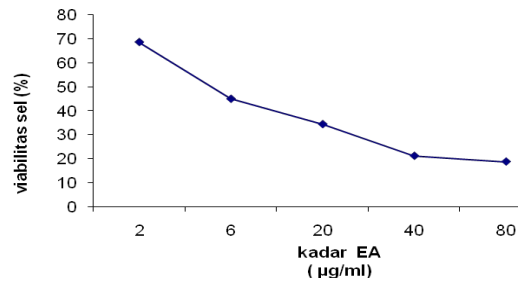
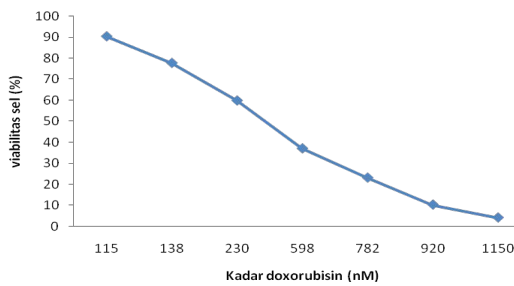
Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis secara statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Kemudian dihitung konsentrasi IC50 dengan menggunakan metode log probit untuk mendapatkan linearitas antara log konsentrasi dengan persen sel hidup. Sitotoksitas sinergistik ditetapkan dengan

menghitung indeks interaksi antara agen kemoterapi dengan ekstrak etanolik daun *F. Septica*.

Hasil dan Pembahasan

Uji sitotoksik dilakukan untuk menentukan potensi sitotoksik EA dan terhadap sel MCF7 dengan parameter kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50% (IC50). Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa EA memiliki efek sitotoksik (IC50= 6 μ g/mL) terhadap sel MCF7. EA memiliki aktivitas sitotoksik cukup poten, karena memiliki harga IC50 yang relatif kecil. Gambar I menunjukkan bahwa kenaikan kadar EA menyebabkan penurunan persen viabilitas sel MCF7.

Berdasarkan hasil percobaan, terlihat bahwa ekstrak etanolik daun awar-awar memiliki efek sitotoksik, sehingga memungkinkan EA mampu meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap agen kemoterapi.



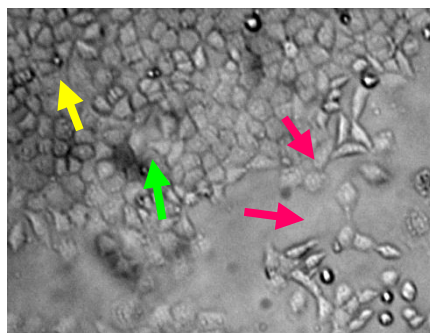
Gambar I. Efek perlakuan EA terhadap pertumbuhan sel MCF7

Doxorubicin merupakan agen kemoterapi yang banyak digunakan dalam pengobatan kanker. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan doxorubicin sebagai model agen kemoterapi. Sebelum dilakukan kombinasi, perlu dilihat terlebih dahulu efek sitotoksik Dox terhadap sel MCF.

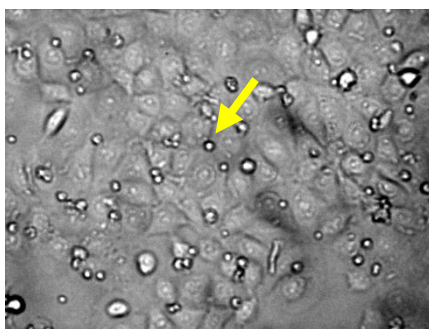
Efek sitotoksik Dox terhadap sel MCF7 dilakukan melalui uji sitotoksik dengan menginkubasi sel kanker dengan

berbagai seri kadar Dox. Hasil uji tersebut memperlihatkan bahwa kenaikan kadar Dox menurunkan persentase kehidupan kedua sel kanker (Gambar I). Pada sel MCF7, Dox memiliki efek sitotoksik dengan nilai Dox sebesar 335 nM. Setelah mengetahui nilai IC₅₀ EA dan Dox sesuai hasil uji sitotoksik sampel uji tunggal, maka pengujian dilanjutkan terhadap kombinasi Dox-EA untuk melihat efikasi kombinasi keduanya terhadap

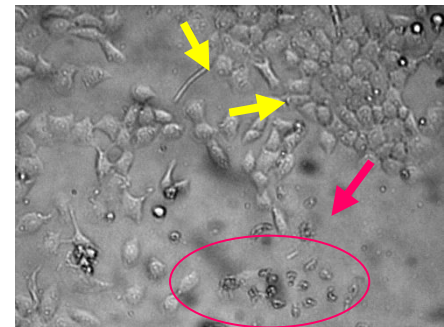
penghambatan pertumbuhan sel MCF7, yaitu apakah sinergis, aditif atau antagonis. Berdasarkan nilai IC_{50} tersebut, maka ditetapkan rasio kadar kombinasi Dox-EA menggunakan kadar dibawah IC_{50} seperti yang tertera pada cara penelitian. Hasilnya menunjukkan bahwa kombinasi EP (0,75; 1,5; 2,25 dan 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) terhadap Dox (50; 100; 150, dan 200 nM) mampu menghambat pertumbuhan sel MCF7 dengan menurunkan persentase viabilitas sel dibanding perlakuan tunggalnya dengan kadar yang sama (Gambar IIC). Sel MCF7 mengalami perubahan morfologi (Gambar II) setelah diberi perlakuan EA tunggal, Dox tunggal, serta EA-Dox. Jumlah sel hidup MCF7 pada perlakuan lebih sedikit dari pada kontrol sel.



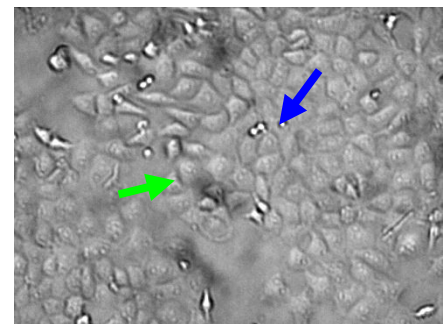
(A)



(B)







(C)



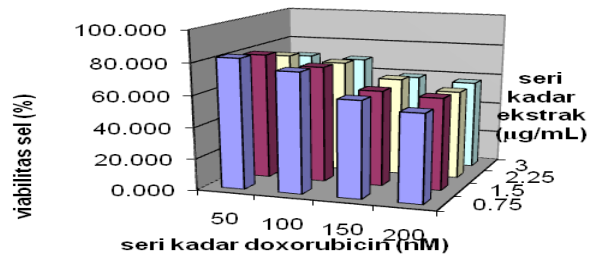
(D)

Gambar II. Morfologi sel MCF7 setelah perlakuan Ekstrak awar-awar konsentrasi 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (A), Dox 200nM (B), kombinasi Ekstrak awar-awar-Dox(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -200Nm) (C) dibandingkan dengan kontrol sel (D). Gambar diambil dengan perbesaran 40x.

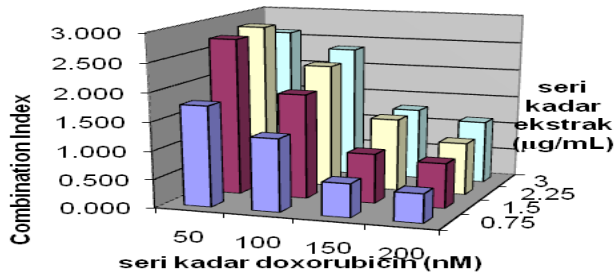
Ket.

-  Sel normal (hidup)
-  Sel abnormal
-  Sel terfragmentasi
-  Sel membelah (mitosis)

Hasil perhitungan indeks kombinasi (CI) menunjukkan bahwa pada perlakuan kombinasi Dox-EA terhadap sel MCF7. Kombinasi Dox 150, 200nM dengan EA 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ memiliki efek sinergis (CI 0,3-0,7); Dox 150,200 nM dengan EA 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ memiliki efek sinergis sedang (CI 0,7-0,9) ; Dox 200 nM dengan EA 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ memiliki efek aditif (CI 0,9-1,1) serta kombinasi lainnya memiliki efek antagonis sedang hingga antagonis (CI 1,1-3,3)(Gambar IIIB,Tabel 1).



(A)



(B)

Gambar III. Efek perlakuan kombinasi Dox-EA terhadap penghambatan pertumbuhan sel MCF7. (A) Pengamatan efek kombinasi EA (0,75-3 µg/mL) dan Dox (50-200 nM) terhadap pertumbuhan sel MCF7 dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada metodologi. (B) kombinasi keduanya memiliki efek sinergis dengan harga CI<0,9. Harga CI (Combination Index) dihitung berdasarkan perbandingan kadar kombinasi dengan kadar sampel tanpa kombinasi.

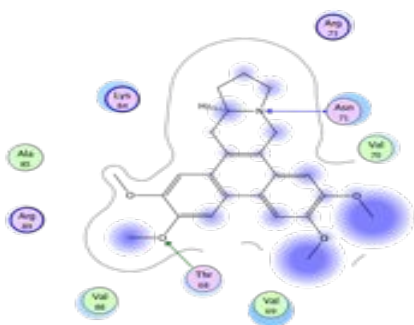
Tabel 1. Nilai CI kombinasi Dox-EA pada sel MCF7

Konsentrasi EP (µg/mL)	Konsentrasi Dox(nM)			
	50	100	150	200
0,75	1,767	1,276	0,590	0,507
1,5	2,752	1,847	0,876	0,790
2,25	2,840	2,189	1,289	0,931
3	2,621	2,351	1,281	1,121

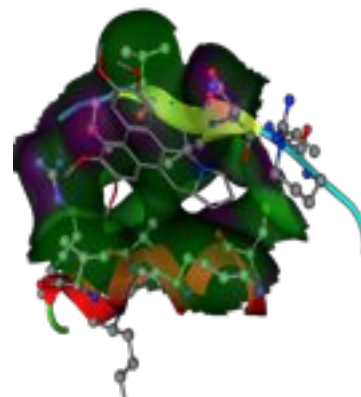
Ket. Bold menunjukkan efek sinergis EA-Dox

Berdasarkan efek sinergistik terhadap sel MCF7, yang diperlihatkan, kombinasi Dox-EA dimungkinkan dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap doxorubicin, sehingga dapat menurunkan resistensi doxorubisin pada sel MCF7 serta menurunkan efek samping dari agen kemoterapi. Melalui studi *docking molekuler* akan ditelusuri mekanisme penghambatan Raf1 yang menginisiasi resistensi sel kanker MCF7.

Hasil docking antara struktur tiloporin dengan Raf-1 menghasilkan score terkecil sebesar -10,5981, sedangkan bentuk interaksi ligand 2D dan 3D tiloporin dengan Raf-1 ditunjukkan oleh gambar IV.



(a)

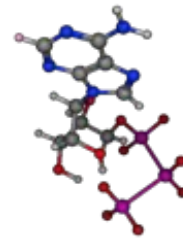


(b)

Gambar IV.(a)Interaksi ligand 2D tiloporin dengan Raf-1.(b) Interaksi ligand 3D tiloporin dengan Raf-1

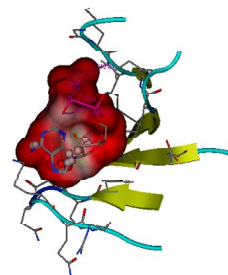
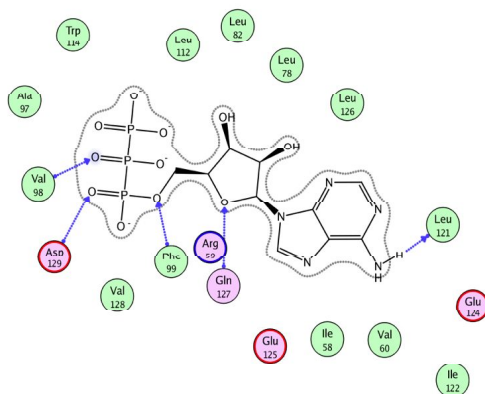
Interaksi tilopirin dengan Raf-1 mempunyai harga energi sebesar -10,5981 dengan interaksi berupa 2 ikatan hidrogen. Tiap ikatan kimia pada interaksi obat dengan reseptor mempunyai harga-harga tertentu. Ikatan hidrogen mempunyai harga sebesar 1-7 kkal/mol(korolkovas,1970). Ikatan hidrogen pertama melibatkan atom N pada tilopirin dengan residu protein Asn 71 dan ikatan hidrogen antara atom O dengan residu protein Thr 69. Data hasil docking antara tilopirin dengan Raf-1 tersaji dalam gambar 19, hasil docking ini mempunyai harga terendah sebesar -10.3741.

Docking ATP dengan Raf-1 mempunyai prinsip kerja yang sama dengan docking tilopirin dengan Raf-1. ATP dioptimasi dengan program MOE ,hasil optimasi struktur ATP ditunjukkan dengan gambar V.



Gambar V. Struktur hasil optimasi struktur ATP dengan energi terendah

Setelah didapat struktur ATP dengan konformasi yang terendah kemudian didocking dengan protein Raf-1 yang sudah dioptimasi. Hasil docking ATP dengan Raf-1 ditunjukkan oleh gambar IV.



Gambar IV. Interaksi ligand antara ATP dengan Raf-1 (a) Interaksi ATP dengan Raf-1 2D(b) Interaksi ATP dengan Raf-1 3D

Interaksi ligand antara ATP dengan Raf-1 berupa ikatan hidrogen. Terdapat total 5 ikatan hidrogen, 3 ikatan hidrogen melibatkan atom O pada fosfat dengan residu protein valin 98, asparagin 129,phenilalanin 99 dan 1 ikatan hydrogen antara atom O pada cincin tetrahidrofuran dengan asam amino

glutamin 127 serta satu ikatan hydrogen antara H pada NH2 terminal dengan asam amino leusin 121. Semua interaksi ini mempunyai harga sebesar -12.940.

Kesimpulan

Kombinasi EA dan Dox berpeluang untuk dikembangkan menjadi obat dalam aplikasi terapi klinis penderita kanker payudara yang resisten pada masa yang akan datang. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar optimasi kombinasi EA dan Dox yang menunjukkan efek sinergis keduanya. Dengan demikian, penelitian ini membuktikan bahwa arah

penggunaan EA sebagai kombinasi Dox dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik Dox. Senyawa alkaloid fenantroindolisidin pada daun awar-awar dapat berkompetisi dengan ATP untuk berinteraksi dengan Raf-1 sehingga aktivasi jalur resistensi dapat terhambat.

Daftar Pustaka

- Chow, C. S. and Bogdan, F. M.(1997). 'A Structural Basis for RNA-Ligase Interaction', *Chemical Reviews*, vol 97, no. 5.
- Clemons, M. and Goss, P. (2001) . 'Estrogen and The Risk of Breast Cancer', *N Eng J Med.*, 334(4):276-283
- Creek and Robertson, M.(1998) , 'Xenoestrogen and Genetic Damage in Breast Cancer', *Stanford Researh Institute*, New York
- Cuang, dkk. (2006). 'Expedient Synthesis and Structure-activity Relationship of Phenanthroindolizidine and Phenanthroquinolizidine Alkaloids', <http://www.rsc.org/publishing/journals/OB/article.asp?doi=b516152e>
- Davis, dkk. (2003). 'Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance', *Clinical Cancer Research*, vol. 9, 1161-1170
- Damu, Amooru G., Kuo, Ping-Chung, Shi, Lian Shi, Li, Chia-Ying, Kuoh, Chang-Sheng, Wu, Pei-Lin, Wu, Tian-Shung.(2005). 'Phenanthroindolizidine Alkaloids from The Stems of *Ficus septica*'
- Doyle, A. and Griffiths, J.B., (2000), *Cell and Tissue Culture For Medical Research*, John Willey and Sons Ltd, New York
- Kitagawa, dkk. (2005). 'Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function', *Biochem Biophys Res Commun* 327:866–870
- Libra, dkk. (2006). 'Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance', *Department of Microbiology & Immunology, Brody School of Medicine at East Carolina University*, vol 46, 249-79
- Meiyanto, E., (2002), *Biologi Molekuler*, Buku Ajar, Proyek QUE, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., Alessandro, N., 2005, Antitumor Effects of Curcumin, Alone or in Combination with Cisplatin or Doxorubicin, on Human Hepatic Cancer Cell. Analysis of Their Possible Relationship to Changes in NF-kB Activation Levels and in IAP Gene Expression, *Cancer Letter*, **224**;53-65
- Nurcahya, B. M.,2007, Efek Antiproliferatif Ekstrak Etanolik Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm.F) terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- Singal, P.K., Iliskovic, N. (1998). 'Doxorubicin-induced cardiomyopathy', *N Engl J Med.*, 339:900-905.
- Staerk, dkk.(2002), 'In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive and Multidrug Resistant Cancer Cells' *J. Nat. Prood*,65, 1299-1302
- Tyagi, dkk. (2004), 'Synergistic Anti Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin and Carboplatin against Human Breast Carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 Cells', *Oncology Reports*, **11**, 493-499