

## PENINGKATAN EFEK SITOTOKSIK DOXORUBICIN OLEH HESPERIDIN PADA SEL KANKER T47D

Setiawati, A.<sup>1</sup>, Susidarti, R.A.<sup>2</sup> dan Meiyanto, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

<sup>2</sup>) Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: nina@usd.ac.id

### ABSTRAK

Doxorubicin pada pengobatan kanker payudara berefek efatocix, cardiotokcix dan resistensi. Kombinasi dengan hesperidin yang bersifat sitotoksik terhadap beberapa sel kanker di uji-coba untuk mengetahui aktifitas sitotoksik nya terhadap viabilitas sel kanker T47D. Pengujian dilakukan dengan 3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5 -difeniltetrazolium bromida (MTT), sedang pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode *double staining* menggunakan *Ethidium Bromide-Acridine Orange*. Hesperidin menunjukkan efek sitotoksik pada konsentrasi 200  $\mu$ M, sedangkan doxorubicin memberikan efek sitotoksik IC<sub>50</sub> pada 15 nM. Pemberian hesperidin 50 dan 100  $\mu$ M meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin 7,5 nM dibandingkan perlakuan doxorubicin tunggal. Efek sitotoksik paling kuat ditunjukkan oleh kombinasi doxorubicin 7,5 nM dan hesperidin 100  $\mu$ M. Kombinasi doxorubicin 7,5 nM dan hesperidin 100  $\mu$ M juga menunjukkan pemacuan apoptosis sel kanker T47D. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hesperidin meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel T47D melalui mekanisme pemacuan apoptosis.

Kata kunci: Doxorubicin, hesperidin, ko-kemoterapi, sel kanker T47D, apoptosis.

## INCREASING CYTOTOXIC EFFECT OF DOXORUBICIN BY HESPERIDIN ON T47D CANCER CELL

### ABSTRACT

Doxorubicin indicated hepatotoxic, cardiotoxic and resistant effect in the breast cancer treatment. Its combination with hesperidin which has cytotoxic effects has been tested to determine its cytotoxic effects on the viability of T47D cancer cell lines. Test carried out using 3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) assay, whereas apoptotic observation performed by double staining method using Ethidium Bromide-Acridine Orange. Results indicated that hesperidin at a concentration of 200  $\mu$ M showed cytotoxic effect while doxorubicin showed strong a cyto-toxic effect at IC<sub>50</sub> 15 nM. Applying hesperidin at 50 and 100  $\mu$ M increased cytotoxic effect of doxorubicin by 7.5 nM as compared with single doxorubicin treatment. The strongest cytotoxic activity was shown by the combination of doxorubicin of 7,5 nM and hesperidin of 100  $\mu$ M. This combination induced apoptosis in T47D cell lines. The result showed that hesperidin increased cytotoxic effect of doxorubicin on T47d cancer cell lines due to enhanced mechanism of apoptosis.

Key words: Doxorubicin, hesperidin, co-chemotherapy, T47D cell lines, apoptosis.

### PENDAHULUAN

Jenis kanker yang paling banyak diderita perempuan adalah kanker payudara (26% dari seluruh kasus kanker), sebanyak 15% kasus berakhir dengan kematian (Jemal *et al.*, 2007). Pengembangan terapi efektif dalam pengobatan kanker payudara sangat diperlukan untuk menekan jumlah kematian penderita. Salah satu agen kemoterapi yang paling banyak digunakan dalam pengobatan kanker payudara adalah doxorubicin (Smith

*et al.*, 2006). Penggunaan doxorubicin menimbulkan efek samping seperti hepatotoksitas (El-Sayyad *et al.*, 2009) dan kardiotoksitas (Minotti *et al.*, 2004) dan resiko resistensi. Pada sel kanker T47D, resistensi perlakuan doxorubicin meningkatkan aktivitas fosforilasi Akt. Akt terfosforilasi mengaktifkan Bcl-X<sub>L</sub> (protein anti-apoptosis) dan menginaktifkan *caspase-9* (inisiator apoptosis) melalui jalur *caspase* (Li *et al.*, 2005).

Salah satu strategi yang digunakan untuk mengatasi resistensi, meminimalkan efek samping dan meningkatkan potensi agen kemoterapi adalah ko-kemoterapi. Ko-kemoterapi dilakukan dengan mengkombinasikan agen kemoterapi dengan agen kemopreventif. Hesperidin merupakan agen kemopreventif yang menghambat proliferasi sel kanker dan memacu apoptosis. Yanez *et al.* (2004) melaporkan hesperidin menunjukkan efek sitotoksik pada beberapa sel kanker, antara lain sel Hep-G2, HCT-116, MDA-MB-231, dan SK-N-MC. Efek sitotoksik hesperidin juga ditunjukkan dengan penghambatan proliferasi sel kanker payudara MCF-7-GFP- $\alpha$ -tubulin (Lee *et al.*, 2007). Uji *in silico* melalui *docking molekuler* menyimpulkan hesperidin menghambat jalur PI3K/Akt yang teraktivasi pada kanker payudara (Hastuti *et al.*, 2008). Pada kanker payudara terjadi beberapa abnormalitas pada jalur PI3K/Akt yang menyebabkan prognosis buruk dan resistensi terhadap kemoterapi (Hennesy *et al.*, 2005).

Sel T47D yang mengalami aktivasi Akt akan resisten terhadap doxorubicin (Li *et al.*, 2005). Sel tersebut mengekspresikan protein p53 yang termutasi, sehingga menyebabkan prognosis dan respon buruk pada kemoterapi (Lacroix *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sinergis hesperidin dengan doxorubicin, sehingga dapat mengatasi permasalahan resistensi dan mengurangi toksisitas agen kemoterapi tersebut.

## BAHAN DAN METODE

Doxorubicin Ebewe 10 mg/5mL (PT. Ferron Par Pharmaceutical, Cikarang, Indonesia). Hesperidin (Sigma Aldrich, No. Katalog H5254-25G) mengandung 80% hesperidin murni HPLC. Hesperidin dan *Doxorubicin* dilarutkan dalam *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Sigma). Sel kanker payudara T47D merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.

Kultur sel ditumbuhkan dalam medium penumbuh kultur *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang mengan-

dung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penicillin streptomisin 1% (v/v) (Gibco). Tripsin-EDTA 0,25% digunakan untuk membantu pelepasan sel yang melekat pada *flask*.

Pengamatan viabilitas sel dilakukan dengan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida] (Sigma), dengan konsentrasi 5mg.mL<sup>-1</sup>. *Stopper* yang digunakan adalah natrium dodesil sulfat (SDS) 10% (w/v) dalam 0,1 N HCl.

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan pengecatan menggunakan pereaksi etidium bromida akridin oranye (EtBr-AO). Larutan induk dibuat dari 50 mg etidium bromida (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dan 15 akridin oranye (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dilarutkan dalam 1 mL etanol 95%, ditambah akuabides hingga 50 mL. Sebelum pemakaian, 1 mL larutan induk diencerkan dengan PBS sampai volume 100 mL. Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian, apabila tidak dikatakan lain, berarti berderajat pro analisis.

### Uji Ko-kemoterapi Menggunakan Metode MTT

Sebanyak 5x10<sup>3</sup> sel/100 $\mu$ L<sup>-1</sup> didistribusikan ke dalam 96 *well plate*, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> untuk beradaptasi dan menempel pada sumuran. Larutan senyawa uji dalam 100  $\mu$ L media kultur ditambahkan ke dalam sumuran, lalu diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir masa inkubasi, medium dibuang dan ditambahkan PBS 100  $\mu$ L tiap sumuran untuk pencucian. MTT 5 mg. Ml<sup>-1</sup> dalam 100  $\mu$ L media kultur ditambahkan pada masing-masing sumuran lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C.

MTT dibuang dengan membalik *plate*, kemudian ditambahkan *stopper* SDS untuk melarutkan garam formazan. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi *plate* digoyang menggunakan *shaker* selama 15 menit, kemudian *plate* dibaca dengan *ELISA Reader* pada  $\lambda = 595$  nm.

### Pengamatan apoptosis menggunakan metode double staining (EtBr-AO)

Sejumlah  $5 \times 10^4$  sel/ $1. \text{mL}^{-1}$  sumuran didistribusikan ke dalam 24-well plate yang telah dilapisi coverslip, kemudian diinkubasi untuk pengadaptasian sel. Sel diberi perlakuan (hesperidin dan doxorubicin) dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Sel dicuci menggunakan PBS kemudian coverslip yang memuat sel dipindahkan ke atas kaca obyek dan ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  pereaksi AE. Sel diamati di bawah mikroskop fluoresen segera setelah pereaksi mengering.

### Uji Ko-Kemoterapi

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran, selanjutnya dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persentase sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Konsentrasi  $\text{IC}_{50}$  dihitung menggunakan regresi linier, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. Sitotoksitas kombinasi ditetapkan dengan membandingkan profil viabilitas sel perlakuan tunggal dan kombinasi dibandingkan dengan sel kontrol.

### Pengamatan Apoptosis

Pengamatan dilakukan secara kualitatif dengan mengamati morfologi sel di bawah mikroskop fluoresensi, setelah pemberian akridin oranye dan ethidium bromida. Sel hidup akan berfluoresensi hijau terang, 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, sedangkan sel yang nekrosis akan berwarna oranye dengan ukuran sel normal (McGahan *et al.*, 1995).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

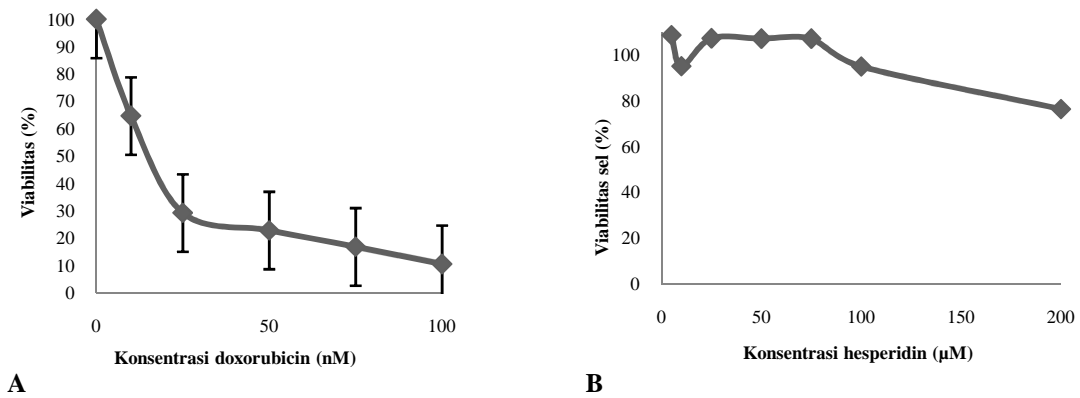
Dalam penelitian ini, viabilitas sel karena pengaruh hesperidin, doxorubicin dan kombinasinya uji sitotoksik menggunakan metode MTT. MTT diabsorpsi oleh sel hidup dan dipecah oleh sistem reduktase

suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi di mitokondria, sehingga aktif menjadi formazan (Doyle & Griffiths, 2000). Viabilitas sel berbanding lurus dengan formazan yang terbentuk. Istilah viabilitas sel ini lebih sesuai daripada kematian sel karena penurunan aktivitas enzim belum tentu menunjukkan adanya kematian sel. Metode MTT lebih sensitif dibandingkan dengan metode sitotoksik lain seperti metode LDH dan metode protein (Fotakis & Timbrell, 2006).

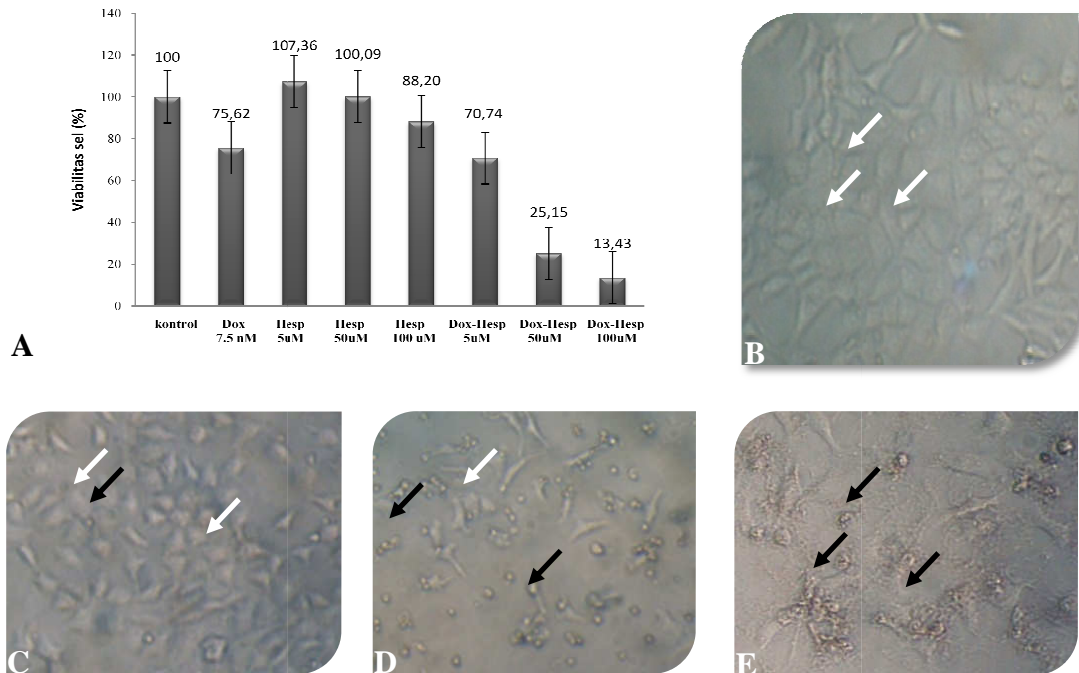
Sensitivitas sel T47D terhadap doxorubicin relatif tinggi dengan harga  $\text{IC}_{50}$  15 nM dan bersifat dose-dependent dengan persamaan  $y = -50.75x + 109.7$  dan  $r = 0,962$  (Gambar 1A). Sensitivitas sel T47D terhadap doxorubicin relatif tinggi dengan harga  $\text{IC}_{50}$  15 nM dan bersifat dose-dependent. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan sel T47D sensitif terhadap doxorubicin (Zampieri *et al.*, 2002). Sensitivitas sel T47D terhadap doxorubicin lebih tinggi dibandingkan dengan sel MCF-7. (Stokia *et al.*, 2008) dengan  $\text{IC}_{50}$  467 nM (CCRC unpublished data).

Tingginya harga  $\text{IC}_{50}$  doxorubicin pada sel MCF-7 diperkirakan karena overekspresi ATP Binding Cassette (ABC) tipe G2 (ABGG2) transporter MDR1 atau P-glikoprotein (PgP). Salah satu substrat PgP adalah doxorubicin (Sakardi *et al.*, 2006) sehingga doxorubicin dapat dikeluarkan kembali dari dalam sel. Resistensi terhadap doxorubicin diperantarai overekspresi PgP pada sel MCF-7, sedangkan perlakuan doxorubicin tidak menyebabkan overekspresi PgP (Lukyanova *et al.*, 2009).

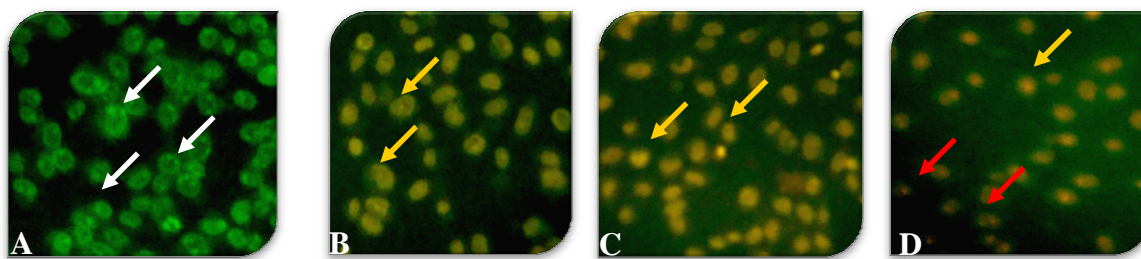
Pada sel T47D, hesperidin bersifat sitotoksik lemah pada konsentrasi hingga 200  $\mu\text{M}$ . Efek sitotoksik yang rendah pada hesperidin disebabkan karena hesperidin bersifat polar dan sulit ditranspor masuk ke dalam sel. Kemungkinan hesperidin sedikit diabsorpsi oleh sel T47D, sehingga pada konsentrasi di bawah 200  $\mu\text{M}$ , hesperidin tidak memberikan efek sitotoksik. Oleh karena itu, diperlukan penelitian mekanisme absorpsi hesperidin untuk mengetahui korelasi kadar hesperidin dalam sel dengan efek sitotoksik pada sel T47D.



Gambar 1. Efek doxorubicin (A) dan hesperidin (B) tunggal terhadap viabilitas sel sel T47D. *Doxo-rubicin* menurunkan persen viabilitas sel dengan harga  $IC_{50}$  15 nM (A) sedangkan hesperidin menurunkan persen viabilitas sel secara signifikan pada konsentrasi 200 µM (B).



Gambar 2. Efek kombinasi hesperidin dengan doxorubicin terhadap viabilitas sel T47D. Viabilitas sel pada perlakuan kombinasi lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan tunggal masing-masing (A). Perubahan populasi dan morfologi sel pada perlakuan kombinasi hesperidin 100 µM-doxorubicin 7.5 nM (E) turun dibandingkan dengan kontrol sel (B), perlakuan hesperidin 100 µM (C) dan perlakuan doxorubicin 7.5 nM. Keterangan:  $\Rightarrow$  sel normal,  $\blackrightarrow$  sel mengalami perubahan morfologi. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan *inverted microscope* dengan perbesaran 400x. Viabilitas sel perlakuan kombinasi doxorubicin 200 nM-hesperidin 50 µM maupun doxoubicin 200 nM-hesperidin 100 µM berbeda signifikan terhadap doxorubicin 200 nM tunggal ( $p < 0,05$ ).



Gambar 3. Doxorubicin dan hesperidin memacu apoptosis pada sel T47D. Pada kontrol sel terlihat semua sel masih hidup (A). Pada perlakuan hesperidin 100  $\mu\text{M}$  terlihat adanya sel yang mengalami apoptosis (B). Pada perlakuan doxorubicin 7.5 nM juga terlihat insidensi apoptosis (C). Kombinasi hesperidin 100  $\mu\text{M}$  dan doxorubicin 7.5 nM menunjukkan potensi pemacuan apoptosis yang lebih tinggi daripada perlakuan masing-masing.  $\Rightarrow$  sel hidup berfluoresensi hijau;  $\Rightarrow$  sel hidup yang mengalami *early apoptosis*  $\Rightarrow$  sel apoptosis.

Efek sitotoksik yang rendah pada hesperidin kemungkinan juga disebabkan oleh efluks hesperidin keluar dari sel. Sel T47D merupakan sel kanker mengekspresikan *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP/ABCG2) (Sarkadi *et al.*, 2006). Substrat ABC (ATP-binding cassette) transporter adalah flavonoid dan metabolitnya (Morris & Zhang, 2006), sehingga hesperidin dapat dikeluarkan kembali dari dalam sel. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui efek efluks hesperidin keluar sel terhadap efek sitotoksiknya pada sel T47D.

Hasil uji sitotoksik tunggal hesperidin yang tidak poten ini bukan berarti hesperidin tidak dapat dikembangkan sebagai agen kokemoterapi. Dari hasil penelitian terdahulu membuktikan bahwa hesperidin mampu berefek sitotoksik, memacu apoptosis dan menghambat proliferasi pada berbagai macam sel (Yanez *et al.*, 2004).

Hasil uji sitotoksik kombinasi antara hesperidin 50 dan 100  $\mu\text{M}$  dengan doxorubicin 7,5 nM memperlihatkan peningkatan efek sitotoksik yang berbeda signifikan ( $\alpha=0,05$ ) dibandingkan dengan efek sitotoksik doxorubicin tunggal (Gambar 2A). Hesperidin potensial dikembangkan sebagai agen kokemoterapi terhadap doxorubicin. Kombinasi hesperidin dan doxorubicin (Gambar 2E) menyebabkan perubahan morfologi yang terlihat jelas dibandingkan dengan perlakuan tunggal (Gambar 2C dan 2D). Pengamatan perubahan morfologi sel dalam uji sitotoksik belum cukup digunakan

sebagai dasar untuk menjelaskan mekanisme peningkatan sensitivitas oleh hesperidin. Perubahan morfologi sel perlu dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui terjadinya apoptosis.

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis penting digunakan sebagai indikasi selektifitas hesperidin sebagai agen kemopreventif. Selektifitas menjadi titik tangkap yang penting dalam pengobatan kanker. Proses kematian sel melalui apoptosis tidak menimbulkan respon inflamasi (Gewies, 2003) dan mengurangi efek samping pada pasien (Herbert, 2003). Pada perlakuan hesperidin dan doxorubicin tunggal terlihat *early apoptosis* yang terdeteksi berwarna oranye dengan morfologi sel berwarna oranye yang masih utuh (Gambar 3B dan 3C). Sel yang mengalami *early apoptosis* masih terdeteksi sebagai sel hidup pada uji sitotoksik. Hasil pengamatan apoptosis memberikan konfirmasi terhadap hasil uji sitotoksik kombinasi. Kombinasi hesperidin dan doxorubicin memacu terjadinya apoptosis yang terlihat dari morfologi sel yang terfragmentasi (Gambar 3D). Hesperidin sinergis dengan doxorubicin dengan meningkatkan kematian sel melalui apoptosis.

Jalur pemacuan apoptosis oleh kombinasi hesperidin dan doxorubicin diprediksikan melalui penghambatan jalur PI3K/Akt. Abnormalitas ditemukan dalam jalur PI3K/Akt pada kanker payudara yang menyebabkan jalur tersebut teraktivasi berlebihan (Hennesy *et al.*, 2005). Doxorubicin terbukti

meningkatkan fosforilasi PI3K/Akt *dose dependent* pada sel kanker payudara T47D, MDA468 dan MCF-7 (Li *et al.*, 2005). Akt mengaktifkan NF- $\kappa$ B yang menghambat apoptosis. Selain NF- $\kappa$ B, Akt juga menghambat fosforilasi Bad, suatu protein pro-apoptosis (Hennesy *et al.*, 2005). Gewies (2003) menyebutkan NF- $\kappa$ B menghambat apoptosis dengan meningkatkan transkripsi Bcl-2. Uji *in silico* dengan uji *docking* molekuler menunjukkan bahwa hesperidin menghambat PI3K secara kompetitif dengan ATP (Hastuti *et al.*, 2008). Penghambatan PI3K/Akt oleh hesperidin dapat memacu terjadinya apoptosis. Keterlibatan PI3K/Akt dalam pemacuan apoptosis oleh perlakuan kombinasi hesperidin dengan doxorubicin pada sel T47D perlu diteliti lebih lanjut.

Fungsi p53 mutan pada sel T47D yang diberi perlakuan doxorubicin digantikan oleh p73 (Vayssade *et al.*, 2005; Irwin and Miller, 2004). Penggantian fungsi p53 oleh p73 berpengaruh pada pemacuan apoptosis dan *cell cycle arrest*. Protein p73 dan p53 mempunyai homologi pada DNA *binding domain* dan jarang termutasi pada sel kanker (Lacroix *et al.*, 2006). Penelusuran lebih lanjut pemacuan apoptosis melalui *p53-independent pathway* perlu dilakukan untuk mengetahui fokus target kombinasi hesperidin dan doxorubicin. Penelitian Lahiry *et al.* (2009) menyimpulkan apoptosis pada sel kanker payudara yang mengalami mutasi p53 melalui jalur *Fas/caspase 8* dan *Akt/Bad*.

Fas mengaktifasi pro-*caspase-8/10* kemudian dilanjutkan dengan aktivasi *caspase-3, 6, 7* yang mengeksekusi apoptosis. *Caspase-8* juga mengaktifkan t-Bid yang memacu mitokondria untuk melepaskan sitokrom-C yang selanjutnya membentuk apoptosome dengan Apaf-1 dan dATP (Gewies, 2003). Hesperidin telah terbukti meningkatkan aktivitas *caspase-3* yang memacu terjadinya apoptosis pada sel kanker kolon SNU-C4 (Park *et al.*, 2009).

*Caspase-3* juga teraktivasi pada sel ginjal yang diberi perlakuan doxorubicin. Doxorubicin juga terbukti mampu menginduksi apoptosis melalui peningkatan aktivasi Fas pada sel ginjal (Ueno *et al.*, 2006). Penelitian mengenai jalur *Fas/ caspase-8*

dan Akt/Bad dalam pemacuan apoptosis oleh perlakuan kombinasi hesperidin dengan doxorubicin pada sel T47D perlu dilakukan.

Doxorubicin memacu apoptosis melalui peningkatan ekspresi Bax pada sel HCC-9204 (Yong *et al.*, 2004). Bax merupakan keluarga Bcl-2 yang pro-apoptosis. Hesperidin telah terbukti meningkatkan apoptosis pada sel kanker kolon SNU-C4 melalui menekan ekspresi Bcl-2, protein antiapoptosis (Park *et al.*, 2009). Pada sel T47D, Bcl-2 tidak terdeteksi setelah perlakuan *doxorubicin* (Stoika *et al.*, 2008). Dalam kondisi fisiologis sel, Bcl-2 menghambat aktivitas Bax (Gewies, 2003). Oleh karena itu, kombinasi hesperidin dan doxorubicin diperkirakan melalui penekanan ekspresi Bcl-2 dan aktivasi Bax. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui peran ekspresi Bcl-2 dan Bax dalam pemacuan apoptosis kombinasi hesperidin dan doxorubicin pada sel T47D.

## SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hesperidin meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel T47D melalui mekanisme pemacuan apoptosis. Penelusuran mekanisme molekuler lebih lanjut diperlukan untuk dapat mengembangkan hesperidin sebagai agen kemoterapi pada kanker payudara.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada DIPA UGM yang mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Tim Pascasajana tahun 2009.

## DAFTAR PUSTAKA

- Doyle, A. & Griffiths J.B. 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research, England: John Willey & Sons LTD.
- El-Sayyad, H.I., Ismail, M.F., Shalaby, F.M., Abou-El-Magd, R.F., Fernando, A., Raj, MRG. & Quhtit, A. 2009. Histopat-hological Effects of Cisplatin, Doxorubicin and 5-Flurouracil (5-FU)



- on the Liver of Male Albino Rats. *International Journal of Biological Science*, 5(5): 466-473.
- Fotakis, G. & Timbrell, J.A. 2006. *In vitro* cytotoxic assays: Comparison of LDH, neutral red and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letter*, 160: 171-177.
- Gewies. 2003. Introduction to Apoptosis. *Apo Review*, 3(1):1-26.
- Hastuti, N, Pratiwi, D., Armandari I., Nur W. Niken, Ikawati, M., Riyanto, S., & Meiyanto, E. 2008. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis [*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle] Menginduksi Apoptosis pada Sel Payudara Tikus Galur *Sprague Dawley* Terinduksi 7,12-Dimetilbenz [a] antrasena. Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. Paper. hal. 94-99. Yogyakarta, Indonesia.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., & Mills, GB. 2004. Exploiting the PI3K/Akt Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Review*, 4(12): 988-1004.
- Herbert, S. 2003. Advances in Breast Cancer Therapy and Chemoprevention: Current Strategies and New Approaches. *Cancer Therapy*, 1: 363- 371.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Jiaquan Xu & Michael J.T. 2007. Cancer Statistic. 2007. *CA Cancer J Clin.*, 57: 43-66.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacology Review*, 56: 185-228
- Lacroix, M., Toillon, R.A. & Leclercq, G. 2006. p53 and Breast Cancer: an Update, *Endocrine-related Cancer*. 13: 293-325.
- Lahiry, L., Saha, B., Chakraborty, J., Adhikarya, A., Mohanty, S., Hossain, DM S., Banerjee, S., Das, Sa, G., & Das, T. 2009. Theaflavin Target Fas/*Caspase-8* and Akt/pBad pathways to Induce Apoptosis in p53-Mutated Human Breast Cancer Cell. *Carcinogenesis*, 31: 259-268.
- Lee, C. L., Wilson, L., Jordan, M.E., Nguyen, V., Tang, J. & Smiyun, G. 2007. Hesperidin Suppressed Proliferations of Both Human Breast Cancer and Androgen Dependent Prostate Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 24: S15 - S19.
- 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 Research*, 7: 589-597.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. & Green, D. R. 1995. *The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro in Cell Death*. San Diego: Academic Press.
- Morris, M.E. & Zhang, S. 2006. Flavonoid-Drug Interaction on ABC Transporter. *Life Science*, 78: 2116- 2130.
- Park, H., Kim, M., Ha, E., & Chung, J. 2008. Apoptotic Effect of Hesperidin through *Caspase-3* Activation in Human Colon Cancer Cells SNU-C4, *Phytomedicine*, 15(1): 147-151.
- Sakardi, B., Homolya, L., Szakacs, G., & Varadi, A. 2006. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in Chemoinmunity Defense System. *Physiology Review*, 86: 1179- 1236.

- Smith, L., Watson, M.B., O'Kane, S.L., Drew, P.J., & Lind, M.J. 2006. The Analysis of Doxorubicin Resistance in Human Breast Cancer Cell Using Antibody Microarray. *Molecular Cancer Therapy*, 5(8): 2115-2120.
- Stoika, R.S., Yakymovych, I.A., Kashchak, N.I., Korynevska, A.V., Klyuchyvka, O.Y., Shafranska, G.I., Yakymovych, M.Y., Zhylchuk, V.Y., Kurdrtavets, Y.Y., & Vorontsova, A.L. 2008. Effect of anticancer Drugs on Production of Transformation of Transforming Growth Factor B and Expression of p53 and BCL-2 Protein by MCF-7 and T47D cell lines of Human Breast Carcinoma. *Experimental Oncology*, 30(1): 35-41.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E. & Jenie, U.A. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*, 14: 216-225.
- Ueno, M., Kakinuma, Y., Yuhki, K., Murakoshi, N., Iemitsu, M., Miyauchi, T., & Yamaguchi, I. 2006. Doxorubicin Induces Apoptosis by Activation of *Caspase-3* in Cultured Cardiomyocytes in Vitro and Rat Cardiac Ventricle in Vivo. *Journal Pharmacological Science*, 101: 151- 158.
- Yanez, J.A., Roupe, K.A., Fukuda, C., Teng, X.W., & Davies, N.M. 2004. Stereospecific Disposition and Anti-Cancer Activity of the Chiral Bioflavonoids Hesperetin and Hesperidin in Rodents, Humans, and Fruit Juices, Canadian Society of Pharmaceutical Sciences Annual Meeting, Vancouver, British Columbia. *Journal of Pharmacy*, 7 (2):76.
- Yong, Z., Jiang, L., Zong, L., Wen-liang, W., & Zhong, W. 2004. Bax Overexpression Enhances Apoptosis Induced by Adriamycin in HCC-9204 Cells. *Chinese Journal of Cancer Research*, 16(3):157-161.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., & Arbuthnot, P. 2002. Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer Cells. *Anticancer Research*, 22:2253-2259.