

Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Kultur Sel Kanker

Induction of Apoptosis by Andrographolide Compound from Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) in Cancer Cells Culture

Sukardiman¹, Abdul Rahman¹, Wiwied Ekasari¹, dan Sismindari²

¹Bagian Ilmu Bahan Alam - Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, e-mail :
maman_ht@yahoo.com

² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Abstract

The objective of this research was to evaluate the activity of andrographolide extracted from sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) in induction of apoptosis in HeLa cells culture in vitro. This research consisted of two phases, the first phase was isolation and identification of andrographolide. The HeLa cells were incubated in RPMI media and Fetal Bovine Serum 10%. The concentration of andrographolide were 0 ; 0.05 ; 0.10 ; 0.25 ; 0.50 ; 1.00 ; 2.50 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 µg/ml dissolved in DMSO. Each andrographolide concentrations was added into HeLa cells culture and then incubated for 24 hours at 37°C in CO₂ incubator. Apoptosis induction was determined by ethidium bromide-acridine orange exclusion and analyzed by fluorescent microscope. The result of this research showed the andrographolide extracted from sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) induced apoptosis activity in HeLa cells culture in vitro with IC₅₀ of 109.90 µg/ml. The result of this experiment suggested to study the effect of andrographolide on expression of gene responsible for apoptosis mechanism in cancer cells in vitro.

Key words: *Andrographis paniculata* Nees, andrographolide, apoptosis

Pendahuluan

Program nasional untuk menemukan obat baru dari sumber bahan alam sekarang ini menggunakan paradigma baru. Paradigma baru tersebut adalah menggabungkan dua kekuatan sumber daya raksasa yang ada yaitu sumber alam hayati Indonesia dengan hasil-hasil riset dunia mengenai genom manusia atau genom lainnya, dan akhirnya akan diperoleh *lead compound* (senyawa penuntun) untuk dikembangkan menjadi obat baru (Sudoyo, 1997; Wahyuningsih, 2003).

Untuk mewujudkan tujuan tersebut di atas dapat digunakan teknologi *High Throughput Screening* (HTS) dimulai dari skrining terhadap ekstrak-ekstrak tanaman Indonesia sebagai *chemical library* dengan menggunakan metode penapisan. Proses penemuan obat melalui HTS dilakukan dengan penapisan tahap kedua dalam bentuk penapisan tingkat fraksi dari ekstrak dan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi dari senyawa bioaktif (senyawa *lead compound*) tersebut dan uji farmakologi (Sudoyo, 1997; Wahyuningsih, 2003).

Upaya pencarian dan penemuan bahan bioaktif dari tanaman yang memiliki aktivitas antikanker menggunakan pendekatan biomolekuler dengan metode *High Throughput Screening* (HTS) telah dilakukan oleh Sukardiman *et al.* (2000). Dalam penelitian tersebut digunakan enzim DNA Topoisomerase sebagai molekul target. Enzim DNA topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihamatnya aktivitas enzim DNA topoisomerase oleh senyawa inhibitor, proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Akibatnya akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi atau kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses di dalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker (Cumming, 1993). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 22 tanaman obat tradisional Indonesia yang diskining aktivitas antikanker dengan metode HTS, akhirnya diperoleh *lead compound* (senyawa penuntun) yaitu senyawa

andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang memiliki aktivitas inhibitor enzim DNA topoisomerase II. Untuk mengembangkan *lead compound* yaitu senyawa andrografolida menjadi obat antikanker yang selektif dapat digunakan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND).

Metode atau teknologi SAAND, yaitu suatu teknologi untuk melakukan skrining aktivitas terhadap senyawa sintesis atau senyawa hasil isolasi bahan alam yang diharapkan memiliki aktivitas antikanker yang selektif yang hanya membunuh sel kanker saja tanpa membunuh sel normal. Salah satu persyaratan utama yang harus dipenuhi yaitu mekanisme antikanker dari senyawa yang diuji tersebut melalui jalur apoptosis, bukan jalur nekrosis. Kematian sel apoptosis adalah kematian sel yang terprogram dan salah satu indikator terjadinya apoptosis pada sel kanker adalah dengan terbentuknya fragmentasi DNA sel kanker. Implementasi aktivitas klinik apoptosis selain menunjukkan efek kemoterapi juga memiliki efek kemopreventif (Hsiang, *et al.*, 1989; Cotran, 1999).

Tujuan penelitian ini adalah menentukan efek induksi apoptosis senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap kultur sel kanker HeLa serta menentukan nilai IC_{50} .

Metode Penelitian

Koleksi Tanaman Sambiloto

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diperoleh dari daerah Kediri, Jatim yang dikumpulkan pada bulan Mei 2003. Bahan yang digunakan adalah seluruh bagian tanaman, bahan tanaman dibersihkan dengan air selanjutnya dipotong-potong, dikeringkan dan dilanjutkan dengan pembuatan serbuk herba sambiloto dengan menggunakan mesin penggiling.

Isolasi dan Identifikasi Andrografolida dari Herba Sambiloto

Metode isolasi andrografolida dilakukan dengan metode Matsuda, 1994. Serbuk herba sambiloto dimaserasi dengan metanol pada suhu 60°C selama 24 jam, dan maserasi diulang sampai 5 kali, hasil maserasi kemudian disaring dan dipekatkan dengan rotavapour untuk mendapatkan ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol ini selanjutnya dipartisisikan dengan air dan etil asetat sama banyak dan dikocok dengan corong pisah. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan dengan rotavapour untuk mendapatkan andrografolida yang masih kotor. Pemurnian kristal andrografolida dilakukan dengan rekristalisasi dengan metanol panas atau kromatografi kolom dengan eluen kloroform: metanol, sehingga diperoleh kristal andrografolida.

Identifikasi andrografolida hasil isolasi dilakukan dengan spektrofotometri FTIR, 1H - ^{13}C NMR dan MS serta dibandingkan dengan andrografolida standar dari Aldrich.

Uji Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida Secara In Vitro

Sel HeLa diresuspensikan dalam media RPMI sehingga diperoleh 5×10^5 sel / ml yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum (FBS), 25 mM HEPES, 100 unit/ml penisilin, 100 µg/ml dan 50 µg/ml gentamisin dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Senyawa andrografolida dilarutkan dalam DMSO dan dibuat dengan konsentrasi: 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 µg/ml kemudian ditambahkan ke dalam biakan kultur sel HeLa dan diinkubasi selama 24 jam.

Efek induksi apoptosis digunakan sel kanker hasil perlakuan dan kemudian sel ditambah RPMI 1640 disentrifugasi pada suhu 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, sebagian sel selanjutnya dipindahkan ke dalam gelas objek dan kemudian ditambah dengan metanol 4% dalam PBS pH7,4 dan dibiarkan selama 25 menit pada suhu 4°C. Campuran ini kemudian dicuci dan ditambahkan pereaksi etidium bromide-akridin orange (1:1), dan biarkan selama 1 menit dalam suhu kamar dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya yang berwarna diamati pada mikroskop fluoresens. Sel yang mengalami apoptosis akan terlihat berwarna orange fluoresens hal ini disebabkan adanya ikatan antara etidium-bromida dengan DNA terfragmentasi dari sel kanker yang mengalami apoptosis, sedangkan untuk sel yang hidup akan menunjukkan warna hijau. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung untuk tiap lapang pandang dengan jumlah minimal 100 sel (Spector, 1998).

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian (anava) satu arah ($\alpha=0,05$) di mana hasil uji bermakna jika diperoleh harga $p \leq 0,05$ dan jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Nilai IC_{50} apoptosis ditentukan dengan menggunakan persen probit.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Isolasi dan Identifikasi Andrografolida dari Herba Sambiloto

Senyawa andrografolida yang diperoleh dari 1 kg serbuk kering herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan metode Matsuda diperoleh kristal andrografolida bentuk persegi empat, tidak berwarna dan berasa pahit sebanyak 12 gram.

Identifikasi senyawa andrografolida yaitu dengan menentukan titik leleh, dan diperoleh titik leleh

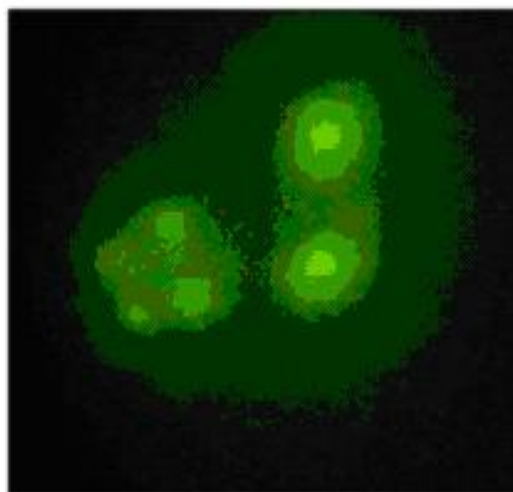
sebesar 229–230°C. Identifikasi secara kualitatif senyawa andrografolida dengan KLT yang menggunakan eluen kloroform: metanol = 9 : 1 menunjukkan harga $R_f=0,56$ dan warna noda ungu dengan penampakan noda anisaldehyda asam sulfat. Hal ini sesuai dengan harga R_f dari senyawa andrografolida standar dari Aldrich. Analisis spektrometri IR dari senyawa andrografolida terlihat adanya puncak-puncak pada 3400 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus OH bebas, serta panjang gelombang 2600 cm^{-1} yang menunjukkan gugus C=O dari gugus lakton. Analisis dengan H-NMR pada daerah medan tinggi (up field) diperoleh sinyal-sinyal pada δ_H 0,69 (s); 1,59 (s); karakteristik untuk gugus metil. Adanya proton yang berada pada keadaan geminal dengan gugus hidroksil terdapat pada keadaan geminal dengan gugus hidroksil terdapat pada δ_H 5,37 (t, melebar, H-14) ; δ_H 3,65 ; 4,43 (-CH₂-OH). Sedangkan pada daerah medan rendah (down field) ditunjukkan adanya proton dari gugus =CH₂ yang tampak pada δ_H 4,86 ; 5,3 (keduanya s , melebar , H₂ -17) , $d\delta_H$ an 7,17 (td, J = 6,5 Hz) untuk proton dari -CH= (H-2). Analisis C-NMR menunjukkan adanya 20 sinyal karbon , yang terdiri dari 2 karbon metil , 8 karbon metilen, 5 karbon metin dan 4 karbon kuartener dan 1 gugus karbonil. Dari spektra tersebut dapat dijelaskan bahwa adanya gugus metil pada δ_c 15,38 (q, C-20) ; 23,87 (q, C-18), gugus = CH₂ pada δ_c 108,804 (t, C-17) , dan adanya karbon yang mengikat gugus OH pada δ_c 64,27 (t,-CH₂OH) ; 79,96 (t, CH-OH) ; 66,07 (d, CH-OH). Selanjutnya untuk gugus karbonil berada pada δ_c 170,77 dan gugus vinil (CH=C) lainnya pada δ_c 147,89 (d, C-12) ; 130,22 (s,C-13). Sedangkan untuk analisis MS dari senyawa andrografolida diperoleh $m/z=332$, hal ini menunjukkan adanya pelepasan ion molekul H₂O.

Penentuan Induksi Apoptosis dari Andrografolida Terhadap Kultur Sel HeLa

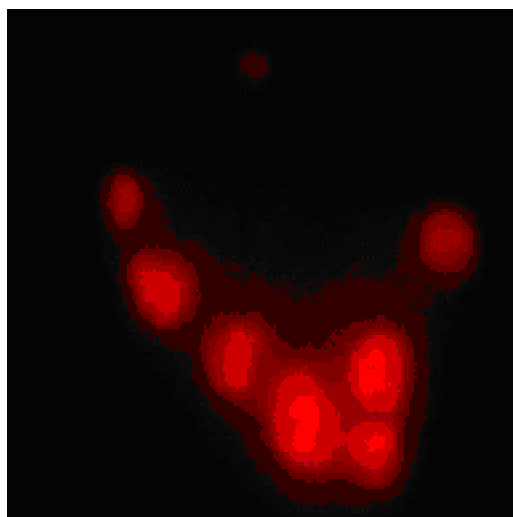
Hasil induksi apoptosis ditentukan dengan menggunakan pewarnaan etidium bromide- karidin orange terjadinya apoptosis ditandai dengan terjadinya flouresensi warna orange untuk sel HeLa yang mengalami apoptosis, sedangkan sel hidup atau normal akan berwarna hijau (Gambar 1). Hal ini disebabkan adanya fragmentasi DNA sel kanker di mana dengan pewarnaan etidium bromide akan terjadi interkalasi antara DNA dengan zat warna etidium bromida dari sel yang mengalami apoptosis (Spector, 1998).

Efek induksi apoptosis senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada sel HeLa terlihat pada konsentrasi 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 $\mu\text{g/ml}$ secara berturut-turut menunjukkan persentase apoptosis

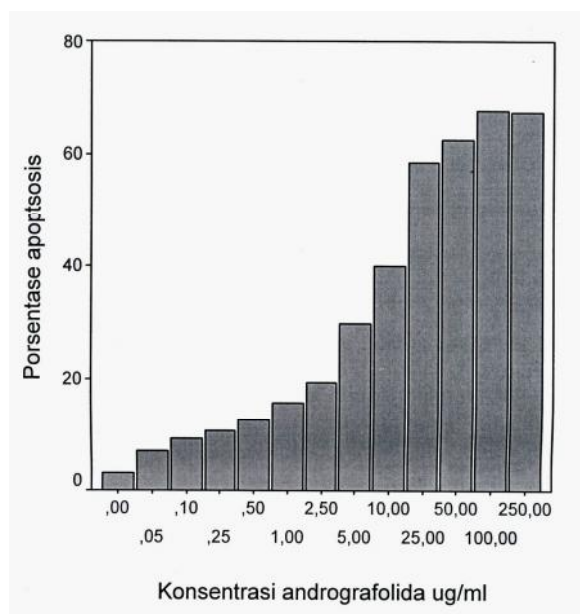
sebesar 3,14 ; 7,18 ; 9,27 ; 10,7 ; 12,8 ; 15,88 ; 19,46 ; 29,75 ; 39,97 ; 58,48 ; 62,53 ; 67,56. Dengan demikian terlihat efek induksi apoptosis senyawa andrografolida dalam kultur sel kanker HeLa tergantung pada konsentrasi andrografolida yang diberikan. Semakin besar konsentrasi andrografolida yang diberikan semakin kuat induksi apoptosisnya dari sel kanker HeLa, sehingga ada hubungan antara dosis andrografolida dengan respon biologis yang ditimbulkannya.



a. Sel normal / hidup



Gambar 1. Hasil pengamatan sel HeLa setelah perlakuan dengan senyawa andrografolida dari tanaman *Andrographis paniculata* Nees dengan pewarnaan etidium bromida-akridin orange menggunakan mikroskop flouresen.



Gambar 2. Histogram pengaruh senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) terhadap induksi apoptosis sel kanker HeLa.

Dari hasil penelitian tersebut di atas, pemberian andrografolida pada kultur sel HeLa dapat menyebabkan terjadinya induksi apoptosis. Hasil ini sesuai dengan penelitian pendahuluan terhadap senyawa andrografolida yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor terhadap aktivitas enzim DNA topoisomerase II (Sukardiman *et al.*, 2000). Fungsi enzim DNA topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Maka akan menyebabkan proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi atau kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses di dalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker. Hal ini dapat dibuktikan pada hasil penelitian di atas, dengan penambahan andrografolida ternyata mampu merusak DNA sel kanker sebagai indikator terjadi kematian sel secara apoptosis. Kematian sel apoptosis adalah kematian sel yang terprogram yang pada penggunaan kliniknya tidak menyebabkan efek samping seperti inflamasi. Karena pada sel-sel yang mengalami apoptosis tidak kehilangan kandungan internal, bila program ini selesai akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan segera dikenali oleh sel-sel makrofag dan ditelan (*engulfed*) (Peter *et al.*, 1997).

Hasil penelitian tersebut di atas juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jamora *et al.* (2001) dengan melakukan isolasi senyawa diterpen dari jamur yaitu senyawa clerocidin yang telah diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim DNA topoisomerase II. Serta melakukan uji induksi apoptosis terhadap kultur sel kanker HeLa. Dari hasil penelitiannya ternyata senyawa diterpen clerocidin memiliki aktivitas apoptosis terhadap sel kanker HeLa. Penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Hoechst dan menggunakan mikroskop fluoresen. Dengan melihat struktur kimia dari clerocidin, maka senyawa tersebut hampir memiliki struktur ruang yang mirip dengan andrografolida. Kedua senyawa tersebut merupakan senyawa diterpenoid yang memiliki gugus -OH bebas pada cincin siklopentana dan adanya gugus laktone atau gugus oksietana siklik, yang diduga sebagai gugus fungsi yang berperan dalam proses kematian sel secara apoptosis.

Penelitian Miao *et al.* (2003) melakukan juga uji induksi senyawa diterpenoid kuinon salvicina, dimana senyawa salvicina memiliki kemiripan struktur kimia dengan andrografolida. Senyawa salvicina juga diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor terhadap aktivitas enzim DNA Topoisomerase II. Serta melakukan uji induksi apoptosis terhadap kultur sel kanker leukemia. Penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan isolasi DNA total dan mengamati fragmentasi DNA dengan metode elektroforesis dengan pewarnaan etidium bromide. Uji aktivitas lain dari senyawa salvicina uji aktivitas induksi apoptosis dari salvicina terhadap beberapa kultur sel kanker MDR (*Multi Drug Resistant*). Hasilnya menunjukkan bahwa senyawa salvicin mampu membunuh sel kanker tersebut dengan mekanisme apoptosis. Di samping itu juga mampu menurunkan ekspresi gen *mdr-1* dan ekspresi gen *P-gp*, serta mampu meningkatkan ekspresi gen *p53*, menurunkan ekspresi gen *bcl-2* yang merupakan gen anti-apoptosis dan akhirnya juga mampu meningkatkan aktivasi enzim caspase 1 dan 3. Enzim caspase adalah enzim proteolitik yang sangat berperan dalam proses akhir terjadinya proses apoptosis (Nagata, 1998; Cotran, 1999; Lowe, 2004; Wittmann 2003). Dengan melihat struktur kimia dari salvicina, senyawa tersebut memiliki struktur ruang yang mirip dengan andrografolida. Dimana kedua senyawa tersebut adalah senyawa diterpenoid yang memiliki gugus -OH bebas pada C-2, C-3 dan adanya gugus laktone atau kuinon, yang diduga sebagai gugus fungsi yang bertanggung jawab dalam proses ikatan antara reseptor dengan obat, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel kanker HeLa khususnya kematian dengan mekanisme apoptosis.

Untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap sel HeLa perlu dilakukan analisis statistik dengan anava satu arah dan derajat kepercayaan sebesar 95%. Dari hasil analisis anava diperoleh harga signifikasi sebesar 0,000 hal ini menunjukkan ada perbedaan bermakna dari sel kanker HeLa yang mengalami apoptosis antar perlakuan. Untuk mengetahui antar kelompok perlakuan mana yang berbeda makna dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil analisis LSD terlihat bahwa antar kelompok perlakuan yaitu konsentrasi andrografolida 0,05 ; 0,10 ; 0,25 ; 0,50 ; 1,00 ; 2,50 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 µg/ml memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol negatif. Konsentrasi andrografolida 0,05 memiliki perbedaan bermakna dengan perlakuan konsentrasi 0 ; 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 µg/ml. Hampir semua perlakuan berbeda makna antar kelompok perlakuan kecuali konsentrasi 0,05 µg/ml dengan 0,10 µg/ml ; konsentrasi 0,10 µg/ml dengan 0,25 µg/ml ; konsentrasi 0,25 µg/ml dengan 0,50 µg/ml dan konsentrasi 100 µg/ml dengan konsentrasi 250 µg/ml.

Nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi senyawa andrografolida dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang mematikan atau menginduksi apoptosis 50% dari sel kanker HeLa, ditentukan dengan menggunakan persen probit dan hasilnya adalah sebesar 109,90 µg/ml.

Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian dan pembahasan di atas maka dapat disimpulkan bahwa senyawa andrografolida hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme apoptosis terhadap sel kanker HeLa dengan harga IC₅₀ sebesar 109,90 µg/ml. Perlu dilakukan uji aktivitas senyawa andrografolida dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap ekspresi gen bertanggung jawab terhadap proses apoptosis sel kanker HeLa secara *in vitro*.

Ucapan Terimakasih

Disampaikan kepada DP3M Ditjen Dikti Depdiknas atas biaya penelitian Ilmu Penelitian Dasar tahun 2004, nomor kontrak: 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004.

Daftar Pustaka

- Cumming, J., Smyth, J.F., 1993. DNA Topoisomerase I and II as target of Rational Design of New Anticancer Drugs, *Ann Oncology*, Aug, 3(7), 533-534.
- Cotran RS, Kumar V, Collin T. 1999. Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease, Sixth Edition, Philadelphia : W.B. Saunders Company, pp 260-325.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., Liu L.F. 1989. Arrest of replication fork by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, *Cancer Research*, 49, 5077-5082.
- Jamora, C., Theodoraki, M.A, Malhotra, V., Theodorakis, A., 2001. Investigation of the Biological Mode of Action of Clerocidin Using Whole Cells Assay, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 1365-1370.
- Lowe Scoot, W., Copero Enrique and Gerard Evan, 2004. Intrinsic Tumour Suppression, *Nature*, 432, 307-315.
- Matsuda, T., Kuroyanagi, M., Sugiyama, S., Umehara, K., Ueno, A., Nishi, K., 1994. Cell Differentiation-Inducing Diterpens From *Andrographis paniculata* Nees, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 42(6), 1216-1225.
- Miao Z.H., Qing Chen, Tong Lian-Jiang, Zhang Jin-Sheng, Ding Jian. 2003. Cytotoxic, apoptosis induction and downregulation of MDR-1 expression by anti-topoisomerase II agent, salicine, in multidrug-resistant tumor cells, *Int J Cancer*, Aug, 10; 160(1): 180-15.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by Death Factor, *Cell*, 88: 355 - 365.
- Peter, M.E., Houfelder, A.E., and Heugartner, M.O., 1997. Advance in Apoptosis Research, *Proc. Acad. Sci, USA*, 94 : 12736-12737.
- Spector, D. 1998. Cells, A laboratory manual, subcellular localization of genes and their product, volume 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sukardiman, Hadi Purwono., Sofia Mubarika, Sismindari. 2000. Penapisan senyawa antikanker dari tanaman obat Indonesia dengan molekul target enzim DNA topoisomerase, Laporan Penelitian Domestic Collaborative Research Grant (DCRG).

- Sudoyo,H., 1997. Pendekatan biomolekuler untuk penemuan obat baru dari sumber daya alam dalam perspektif Indonesia, Cermin Dunia Farmasi, No 31, hal 9-11.
- Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG & Bhalla K. (2003). Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. Cancer Res 63: 93–99.
- Wahyuningsih,M.S.H., Sofia Mubarika, Ibnu G. Gandjar, Subagus Wahyuono. 2003. Pencarian Senyawa Antikanker dari Bahan Alam, Majalah Obat Tradisional, Vol 8 No 26: 9-11