

EKSTRAK ETANOLIK AWAR-AWAR (*Ficus septica*) SEBAGAI AGEN KEMOPREVENTIF SELEKTIF PADA BERBAGAI MACAM SEL KANKER

(*ETHANOLIC LEAVES EXTRACT OF AWAR-AWAR (Ficus septica) AS SELECTIVE CHEMOPREVENTIVE AGENT ON VARIOUS CANCER CELLS*)

Ika Rahmawati Sutedjo^{1*}, Herwandhani Putri², Edy Meiyanto³

¹Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121

*e-mail: ikarahmawati.fk@unej.ac.id

^{2,3}Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

e-mail: ccrc@ugm.ac.id

ABSTRAK

Kata kunci:

Ficus septica

HeLa

MTT assay

4T1

MCF7/HER2

Vero

WiDR

Penggunaan agen kemoterapi dalam waktu lama menimbulkan berbagai efek samping, hal ini dikarenakan kurang selektifnya agen kemoterapi terhadap sel kanker. Agen kemopreventif yang selektif diperlukan untuk mengurangi efek samping dan meningkatkan efektivitas terapi kanker. Awar-awar (*Ficus septica*) merupakan bahan alam yang berpotensi sebagai agen kemopreventif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanolik daun awar-awar (EFs) terhadap sel kanker payudara 4T1 dan MCF7/HER2, sel kanker kolon WiDR, sel kanker serviks HeLa, dan sel epitel normal Vero. Uji sitotoksitas dilakukan dengan MTT assay. Parameter yang diperoleh dari uji sitotoksik adalah IC50. Indeks selektifitas diperoleh dari rasio IC50 EFs pada sel kanker tertentu dibanding sel epitel normal Vero. Hasil penelitian ini menunjukkan EFs memiliki aktivitas sitotoksik pada semua sel kanker dan sel normal dengan IC50 sebesar 61,2 µg/mL untuk sel 4T1; 48 µg/mL untuk sel MCF7/HER2; 122,4 µg/mL untuk sel HeLa; 75,9 µg/mL untuk sel WiDR; dan 394,8 µg/mL untuk sel Vero. Dapat disimpulkan bahwa EFs bekerja selektif pada berbagai sel kanker dengan indeks selektifitas ≥ 3 .

ABSTRACT

Keywords:

Ficus septica

HeLa

MTT assay

4T1

MCF7/HER2

Vero

WiDR

Treatment of cancer such as surgery, radiotherapy and chemotherapy have many side effects such as cardiotoxicity, hepatotoxicity, and immune-suppressant, therefore selective chemopreventive agent is needed. Awar-awar (*Ficus septica*) is a traditional medicinal plant that is known as a potential cancer chemopreventive agent. The purpose of this study was to determine the cytotoxic effect of ethanolic leaves extract of awar-awar (EFs) against 4T1 and MCF7/HER2 breast cancer cells; WiDR colon cells cancer; HeLa cervix cells cancer; and Vero normal cells. The cytotoxic test was performed by MTT assay. The parameter obtained from the cytotoxic test was IC50. Selectivity index was determined from IC50 ratio of cancer cells to normal cells Vero. The results showed that EFs has a cytotoxic activity on cancer cell line with IC50 61.2 µg/mL on 4T1; 48 µg/mL on MCF7/HER2; 122.4 µg/mL on HeLa; 75.9 µg/mL on WiDR; and 394.8 µg/mL on Vero. It can be concluded that EFs has high selectivity on various cancer cells with selectivity index more than 3.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia, kurang lebih 8,2 juta kematian setiap tahun disebabkan oleh penyakit ini. Kanker paru, hati, kolorektal, dan payudara adalah penyebab kematian tersering, selain itu kanker payudara dan serviks merupakan kanker dengan prevalensi terbanyak di Indonesia (Kemenkes RI, 2015). Agen kemoterapi merupakan agen yang mencegah atau menghambat pertumbuhan sel kanker. Metode kemoterapi dilakukan dengan memberikan senyawa kimia untuk membunuh sel kanker. Namun penggunaan agen kemoterapi berkepanjangan menyebabkan melemahnya sistem imun dan resistensi sel kanker karena kurang selektifnya agen kemoterapi terhadap sel kanker. Hal tersebut merupakan penyebab utama kegagalan terapi kanker (Staerk et al., 2002). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan agen kemoterapi atau kemopreventif yang lebih aman dan selektif.

Saat ini agen kemopreventif dari bahan alam telah menjadi alternatif pilihan dalam pengobatan kanker, salah satunya adalah awar-awar (*Ficus septica*). Awar-awar banyak ditemukan di Jawa dan Madura, tumbuh pada daerah dengan ketinggian 1200 m dpl, banyak ditemukan di tepi jalan, semak belukar dan hutan terbuka (Syamsuhidayat & Hutapea, 1993). Awar-awar secara tradisional dimanfaatkan daunnya untuk obat penyakit kulit, radang usus buntu, mengatasi bisul, gigitan ular berbisa dan sesak napas. Akarnya dimanfaatkan untuk penawar racun dan antiasma. Getahnya dimanfaatkan untuk mengatasi bengkak-bengkak dan kepala pusing sedangkan buah untuk pencahar. Tumbuhan ini mengandung alkaloid fenanthroindolisidin yang diketahui mempunyai aktivitas sitotoksik melalui inhibisi protein dan sintesis asam nukleat (Lansky & Paavilainen, 2011). Beberapa analog tylophorine menunjukkan inhibisi signifikan pada aktivator protein-1 (AP-1), cyclic AMP *response elements* dan *nuclear* faktor-B (NF- κ B) (Gao, 2011). Awar-awar telah terbukti bersifat sitotoksik pada beberapa macam sel kanker diantaranya sel kanker payudara MCF7 dan T47D dengan nilai IC 50 berturut-turut sebesar 13 μ g/mL dan 6 μ g/mL (Mubarak et al., 2008; Pratama et al., 2011). Akan tetapi belum pernah dibuktikan apakah efektifitas sebagai antikanker tersebut bersifat selektif, yaitu hanya bekerja pada sel kanker dan aman dari efek samping merugikan pada sel normal.

Penelitian ini mempelajari aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun awar-awar pada beberapa sel kanker lain, yaitu sel kanker payudara metastasis 4T1

dan MCF7/HER2, sel kanker kolon WiDR, serta sel kanker serviks HeLa. Selektivitas ekstrak etanolik awar-awar pada berbagai sel kanker dibuktikan dengan membandingkan efek sitotoksik pada sel kanker dengan sel normal Vero melalui parameter nilai SI (*selectivity index*). Data-data ilmiah tersebut akan menjadi dasar penggunaan awar-awar sebagai agen kemopreventif yang efektif dan selektif untuk berbagai jenis kanker.

METODE

Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan adalah daun tumbuhan awar-awar yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanolik 70%. Proses ekstrak tersebut dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Indonesia. Determinasi tanaman telah dilakukan oleh bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Sel Line Kanker

Sel kanker manusia yang digunakan adalah sel kanker payudara 4T1 dan MCF7/HER2, sel kanker serviks HeLa, sel kanker kolon WiDR, dan sel epitel normal Vero yang merupakan koleksi CCRC (*Cancer Chemoprevention Research Center*) Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Bahan Kimia

Etanolik 70%, media RPMI 1640 dan DMEM *hi-glucose* (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), penisilin-streptomisin (Sigma), Fungizone (Sigma), Dimethyl sulfoxide (DMSO), tripsin-EDTA (Sigma) (tripsin 0,25%), tripan blue (Sigma), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) difenil tetrazolium bromida (MTT) (Sigma), Sodium Duodecyl Sulfate (SDS) dan Phosphat Buffer Saline (PBS) (Invitrogen).

Uji Sitotoksitas Dengan Metode MTT Assay

Sel didistribusikan ke dalam sumuran (10.000 sel/sumuran untuk sel HeLa dan Vero, 12.000 sel/sumuran untuk sel MCF7/HER2 serta 5.000 sel/sumuran untuk sel 4T1 dan WiDR), kemudian diadaptasikan hingga normal kembali. Sel diinkubasi dengan berbagai seri konsentrasi senyawa uji selama 24 jam pada inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, media dalam masing-masing sumuran diganti dengan suspensi 100 μ l MTT 5 mg/mL. Diinkubasi kembali selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stopper (HCl 10% dalam SDS), kemudian diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada alfa 595 nm (Mosmann, 1983).

Analisis Data

1. Perhitungan IC50

Data absorbansi dikonversi menjadi viabilitas sel (persen sel hidup) yang dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Abs. Sel perlakuan} - \text{Abs. Kontrol media}}{\text{Abs. Kontrol sel} - \text{Abs. Kontrol media}} \times 100\%$$

Nilai viabilitas sel pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi tertentu dianalisis menggunakan regresi linier untuk mendapatkan nilai IC50 (Fresney, 2005).

2. Perhitungan SI untuk selektifitas

Selektifitas ditentukan dengan menggunakan parameter SI (*Selectivity Index*) dengan rumus:

$$SI = \frac{\text{IC50 pada sel Vero}}{\text{IC50 pada sel kanker}}$$

Ekstrak dikatakan mempunyai selektifitas yang tinggi apabila nilai SI ≥ 3 , dan dikatakan kurang selektif apabila nilai SI < 3 (Prayong, 2008).

HASIL

Hasil uji sitotoksitas ekstrak etanolik awar-awar (EFs) terhadap sel 4T1, MCF7/HER2, WiDR, HeLa dan Vero menunjukkan EFs bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan berbagai sel kanker tersebut dengan fenomena *dose dependent*, yaitu efek toksik meningkat seiring peningkatan konsentrasi (gambar 1). Melalui pengamatan menggunakan mikroskop dapat diketahui bahwa perlakuan EFs memberikan perubahan terhadap morfologi sel kanker (gambar 2). Hasil analisis dengan regresi linier diperoleh nilai IC50 masing-masing sel kanker, yang ditunjukkan pada tabel 1. Penelitian ini menunjukkan EFs bersifat poten terhadap sel kanker payudara MCF7/HER2 & 4T1 serta sel kanker kolon WiDR (Tabel 1). Prayong et al. menyatakan senyawa dari bahan alam dapat disebut poten jika memiliki nilai IC50 kurang dari 100 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan IC50 EFs pada sel Hela lebih dari 100 $\mu\text{g/mL}$. Selektifitas EFs dievaluasi dengan menggunakan parameter *selectivity index* (SI). Hasil analisis selektifitas menunjukkan bahwa EFs selektif terhadap semua sel *line* yang diuji. Hal tersebut terlihat dari nilai SI yang lebih dari 3 (Tabel 2).

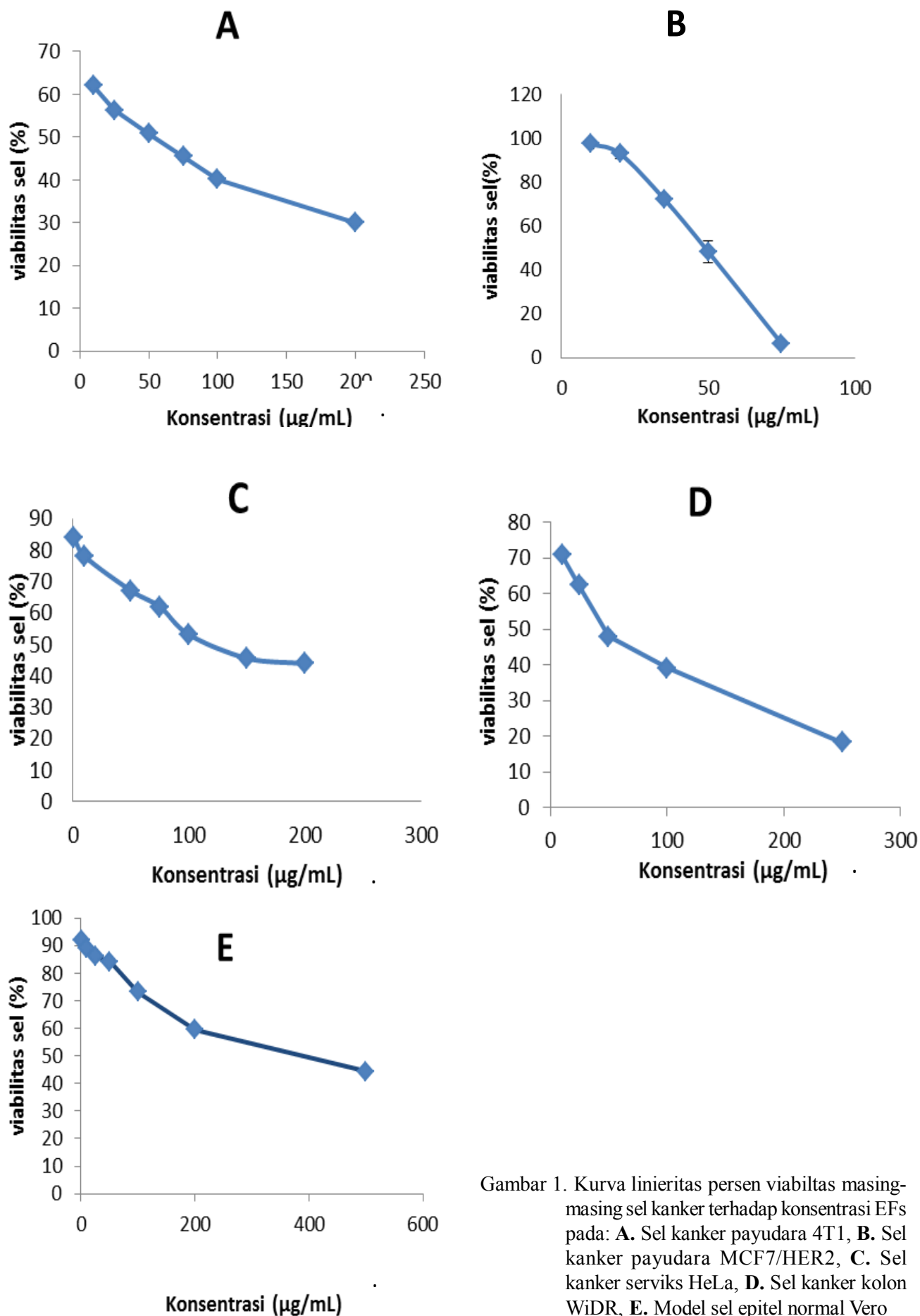
PEMBAHASAN

Uji sitotoksitas terhadap sel kanker merupakan pengujian dasar pada obat antikanker maupun senyawa kemopreventif. Melalui parameter

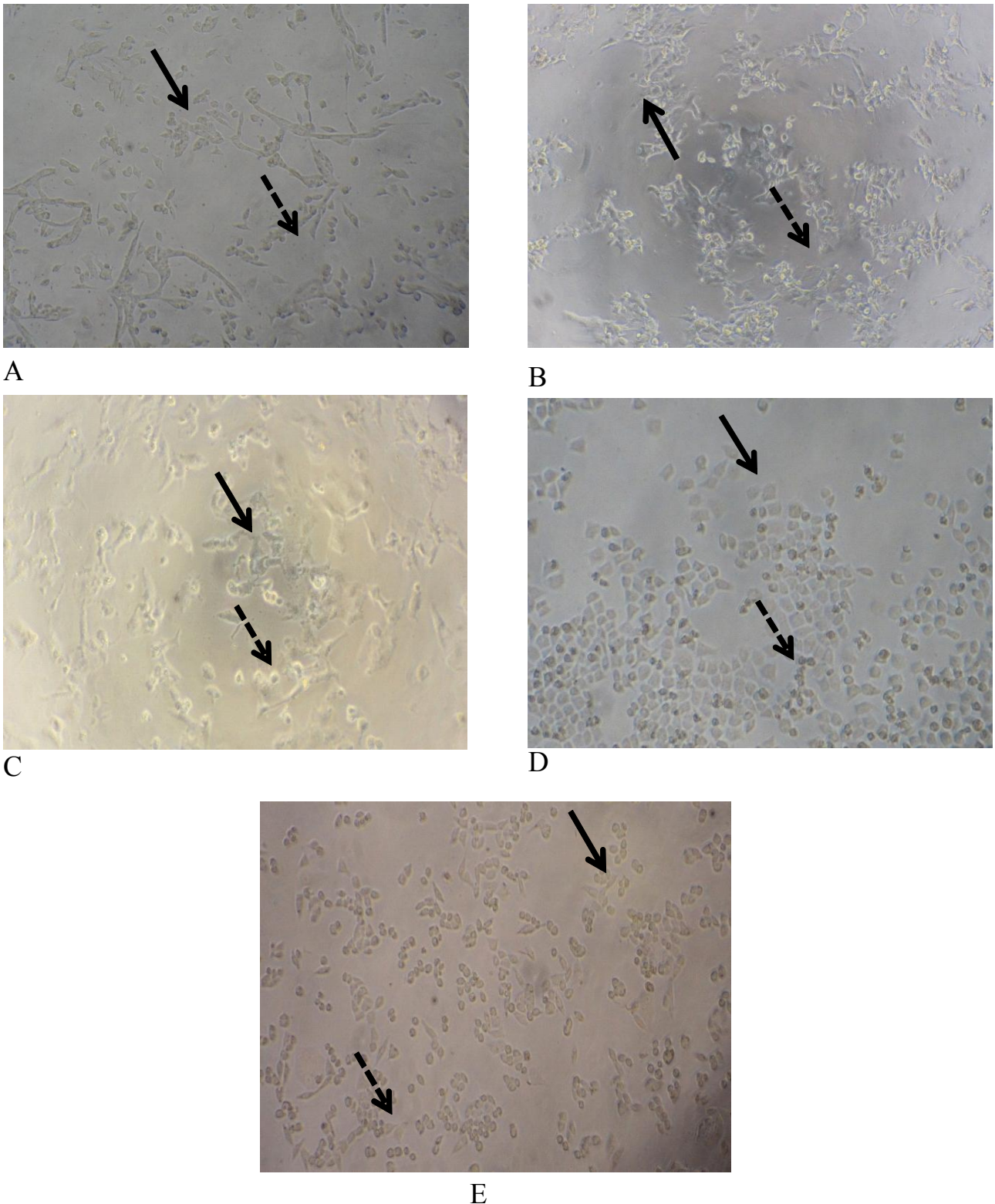
IC50, dapat dilihat potensi toksik senyawa/bahan yang diujikan. Salah satu metode yang umum digunakan untuk uji sitotoksitas secara *in vitro* adalah metode MTT. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dilakukan penentuan persen viabilitas. Selanjutnya bersama dengan data kadar sampel yang digunakan dilakukan penentuan nilai IC50 (Fresney, 2005). Pada penelitian ini EFs terbukti bersifat sitotoksik terhadap sel 4T1, MCF7/HER2, HeLa, WiDR, dan Vero.

Penelitian lain menyebutkan bahwa awar-awar menghambat pertumbuhan berbagai sel kanker, yaitu *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 IC50 7 ± 3 nM untuk sel KB-3-1 dan IC50 10 ± 4 nM untuk sel KB-VI (Staerk et al., 2002). Batang *Ficus septica* yang terbukti mengandung alkaloid fenantroindolisidin mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker nasofaring HONE-1 (*human nasopharyngeal carcinoma*) dan sel kanker lambung NUGC (*human gastric cancer*) (Prayong et al., 2008). Kandungan kimia lain yang diisolasi dan diduga berperan sebagai zat aktif dari daun awar-awar adalah senyawa flavonoid genistin dan kaempferitrin, kumarin, senyawa fenolik pirimidin dan alkaloid antofin, 10S,13aR-antofin N-oxide, dehidrotylophorin, ficuseptin A, tylophorin, 2-Demetoksitylophorin, 14?-Hidroksiisotyloprebin N-oxide, saponin triterpenoid, serta sterol (Damu et al., 2005; Lansky et al., 2008). Mekanisme sitotoksitas kandungan isoflavonoid genistin mampu memacu apoptosis melalui peningkatan aktivitas caspase 3 (Choi et al., 2007). Kumarin umbelliprenin dan senyawa fenolik resveratrol juga diketahui memiliki aktivitas sitotoksik. Kumarin eskuletin mampu menginduksi apoptosis dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2 (Chu et al., 2001), senyawa fenolik resveratrol menginduksi apoptosis melalui *down-regulation* NF κ B pada penghambatan jalur signaling PI3K/Akt yang mengakibatkan penurunan ekspresi protein Bcl-2 (Guisado et al., 2005).

Perbedaan nilai IC50 antar sel terjadi karena adanya perbedaan karakteristik masing-masing sel yang digunakan. MCF7/HER2 atau MCF7/*clone* 18 merupakan *sel line* MCF7 yang ditransfeksi gen yang menyebabkan overekspresi protein HER2/neu. Liang et al. (2003) menyisipkan fragmen cDNA HER2 dengan vektor pcDNA3.0 pada sel MCF7 untuk memperoleh sel ini. Sel *line* MCF7 sendiri mempunyai karakteristik merupakan sel karsinoma payudara duktal invasif yang diambil dari cairan efusi pleura, mempunyai reseptor untuk hormon esterogen dan



Gambar 1. Kurva linieritas persen viabiltas masing-masing sel kanker terhadap konsentrasi EFs pada: **A.** Sel kanker payudara 4T1, **B.** Sel kanker payudara MCF7/HER2, **C.** Sel kanker serviks HeLa, **D.** Sel kanker kolon WiDR, **E.** Model sel epitel normal Vero



Gambar 2. Morfologi sel akibat: A. Perlakuan EFs dengan konsentrasi 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel 4T1, B. Perlakuan EFs dengan konsentrasi 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel MCF7/HER2, C. Perlakuan EFs dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel HeLa, D. Perlakuan EFs dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel WiDR, E. Perlakuan EFs dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel Vero

: ----> Sel viabel

: -.-> Sel non viabel, mengalami perubahan morfologi menjadi bulat

Tabel 1. Nilai IC₅₀ EFs pada berbagai sel line kanker dan sel normal

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)				
	4T1	MCF7/HER2	HeLa	WiDR	Vero
Ekstrak etanolik awar-awar	61,2	48	122,4	75,9	394,8

Tabel 2. Selektifitas EFs pada berbagai sel kanker

Jenis sel	Nilai SI	Interpretasi
4T1	6,45	Selektif
MCF7/HER2	8,23	Selektif
HeLa	3,23	Selektif
WiDR	5,20	Selektif

progesteron, dan termasuk tipe sel epitel luminal (Anonim, 2007). HER2/neu merupakan protein dengan berat 185 kDa, produk dari protoonkogen HER2/cErBB2. Protein ini berperan sebagai reseptor tirosin kinase transmembran (anggota famili EGFR), bekerja dengan memfosforilasi kompleks heterodimer untuk aktivasi jalur sinyal melalui PI3K/Akt atau MEK/ERK *pathway* yang bertanggungjawab terhadap proliferasi dan survival sel kanker. Sekitar 15-20% kanker payudara mengekspresikan HER2, hal ini berkaitan dengan prognosis kanker yang lebih buruk seperti ukuran yang lebih besar, *grade nuclear* yang tinggi, fraksi fase S yang tinggi, aneuploid, dan penurunan reseptor estrogen (Ménard et al., 2001). Sel kanker payudara metastasis 4T1 merupakan kanker payudara epitel duktus (positif E-cadherin), mengekspresikan p63, *smooth muscle actin*/SMA, & cytokeratin 5/6, bermetastasis jauh ke beberapa organ, antara lain paru, hati, otak, dan tulang (Tao et al, 2008). 4T1 juga merupakan sel dengan level protein P53 rendah dan tidak mengekspresikan protein MMP2 (Tao et al, 2008; Yerlikaya et al., 2011). Sel kanker serviks HeLa mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 berkaitan dengan tumor supresor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin dan menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk *cell cycle progression* (DeFillippis et al., 2003). sel HeLa juga mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type (Goodwin & DiMaio, 2000). Sel

WiDr merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Salah satu karakteristik dari sel WiDr ini adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu proliferasi sel WiDr (Palozza et al., 2005). Pada sel WiDr, terjadi mutasi p53 pada posisi 273 sehingga terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin. Apoptosis pada sel WiDr dapat terjadi melalui jalur independent p53, diantaranya melalui aktivasi p73 (Levrero et al., 2000). Sel Vero merupakan sel *line* yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Sel Vero berbentuk poligonal dan pipih, merupakan sel monolayer dan termasuk jenis *epithelial-like*. Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen (Sons, 2008).

Selektifitas agen kemopreventif artinya hanya sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini berbeda dengan cara kerja kemoterapi yang menyerang baik sel kanker maupun sel normal. Akibatnya sel normal ikut mati sehingga timbul berbagai macam efek samping. Cara agen kemopreventif membedakan sel kanker dan sel normal adalah berdasar kebutuhan sel akan ATP (Adenosine Triphosphate). Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibanding sel normal, maka sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. Hal ini dideteksi oleh agen kemopreventif, selanjutnya bahan tersebut masuk ke dalam sel kanker dan menempel pada dinding dalam mitokondria untuk memblokir produksi ATP. Akibatnya suplai energi untuk sel kanker terhenti, sel kanker menjadi lemah dan mati (Alali et al., 1999). Pada penelitian ini awar-awar

terbukti selektif bekerja pada sel 4T1, MCF7/HER2, HeLa, dan WiDR.

SIMPULAN

Ekstrak etanolik daun awar-awar (*Ficus septica*) dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis sel kanker (4T1, MCF7/HER2, WiDR, HeLa) secara selektif, sehingga ekstrak ini mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen kokemoterapi. Meskipun demikian, masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat mengaplikasikan kesimpulan tersebut pada pasien kanker.

SARAN

Perlu dilakukan identifikasi, pemisahan dan pengujian lebih lanjut senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun awar-awar. Pengembangan penelitian berikutnya dapat mengkaji sinergisitas kombinasi ekstrak etanolik daun awar-awar dengan agen kemoterapi dan penelusuran jalur molekuler yang mendasari efek sitotoksitas bahan tersebut.

KEPUSTAKAAN

Alali, F.Q., Liu, X.X., & McLaughlin, J.L., 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Product* 62(3): 504-40.

Anonim, 2007. ATCC Cell Biology, available from <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=HTB-22>, cited in 23 September 2016.

Choi, J. E., Kim, T., & Lee, M. S., 2007. Pro-apoptotic Effect and Cytotoxicity of Genistein and Genistin in Human Ovarian Cancer SK-OV-3 Cells. *Life Sciences*, 80: 1403-1408.

Chu, C. Y., Tsai, Y. Y., Wang, C. J., Lin, W. L., & Tseng, T. H., 2001. Induction of Apoptosis by Esculetin in Human Leukemia Cells. *Eur J Pharmacol*, 416(2):25-32.

Damu, A.G., Kuo, P.C., Shi, L.S., Li, C.Y, Kuoh, C.S., Wu, P.L., Wu, T.S., 2005. Phenanthroindolizidine Alkaloids from the Stems of *Ficus septica*, *J. Nat. Pro.*, 68:1071-1075.

DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D., 2003. Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology* 77 (2): 1551-1563.

Fresney, R.I., 2005. *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique*. 5th Ed. John Wiley & Sons. 120-135.

Gao, H., Lamusta, J., Zhang, W.F., Salmonsens, R., Liu, Y., O'Connell, E., et al. 2011. Tumor Cell Selective Cytotoxicity & Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Ficus septica*. *N Am J Med Sci*. 4(2):62-66.

Goodwin, E.C. & DiMaio, D. 2000. Repression of Human Papillomavirus Oncogenes in HeLa Cervical Carcinoma Cells Causes the Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways. *Biochemistry*. 97:23.

Guisado, E. P., Merino, J. M., Navarro S. M., Benayas M. J., Centeno F., Barrientos A., and Salguero P. M., 2005. Resveratrol-induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Involves a Caspase-independent Mechanism with Down-regulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer*. 115: 74-84.

Kemenkes RI, 2015. *Situasi Penyakit Kanker*. Jakarta: Pusat data dan informasi Kementrian Kesehatan RI.

Lansky, E. P. & Paavilainen, H. M. 2011. *Traditional Herbal Medicines for Modern Times Figs The Genus Ficus*. New York: Taylor and Francis Group, LLC

Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., and Newman, R. A., 2008. *Ficus spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents*, *Journal of Ethnopharmacology*, 119 : 195-213.

Levrero, M., Laurenzi, V. De, Constanzo, A., Sabatini, S., Gong, J., Wang, J.Y.J. and Melino, G., 2000. The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Functions, *Journal of Cell Science*, 113:1661-1670.

Liang, K., Lu, Y., Jin, W., Ang, K.K., Milas, L. Fan, Z., 2003. Sensitization of Breast Cancer Cells to Radiation by Trastuzumab. *Mol Cancer Ther* 2003; 2:1113-1120.

Ménard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R., and Balsari, A., 2001. HER2 as a Prognostic Factor in Breast Cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:67-72.

Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Mubarok, M.F., Sekti, D.A., Ainun, W., 2008. Peningkatan Aktivitas Sitotoksik Doxorubicin terhadap Sel MCF-7 Menggunakan Ekstrak Etanolik Daun Awar-awar (*Ficus*

septica Burm. f.), Prosiding KONGRES ILMIAH XVI ISFI 2008. ISBN: 978- 979-95107-6-2. Penerbit : Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia (In Indonesian).

- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P. and Ranelletti, F.O., 2005. -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *J.Nutr.*, 135:129-136.
- Pratama, R.H., Ikhtiarsyah, Y.G., Anindyajati, A., Fitriasari, A., Ikawati, M., Meiyanto, E., 2011. Awar-awar Leaves Ethanolic Extract Sinergistically Enhances Cytotoxic Effect of Doxorubicin on T47D Breast Cancer Cells. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 9, 67-71.
- Prayong, P., Barusrux, S., Weerapreeyakul, N., 2008. Cytotoxic Activity Screening of some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapi*.79(7-8):598-601. doi: 10.1016/j.fitote.2008.06.007.
- Sons, W.,J.,. 2008. Vero Cell. *Curr Protoc. Microbiol* 11:A.4E.1-A.4E.7.
- Staerk, D., Lykkeberg, A.K., Christensen, J., Budnik, B.A., Abe, F., & Jaroszewski, J.W., 2002. In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive and Multidrug Resistant Cancer Cells, *J. Nat. Prod*, 65:1299-1302.
- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J. R., 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., Sahagian, G.G, 2008. Imagable 4T1 Model for the Study of Late Stage Breast Cancer. *BMC Cancer*, 8:228.
- Yerlikaya, A.I., Okur, E., & Ulukaya, E., 2012. The p53-independent Induction of Apoptosis in Breast Cancer Cells in Response to Proteasome Inhibitor Bortezomib. *Tumour Biol*. 5:1385-92. doi: 10.1007/s13277-012-0386-3.