

Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7

Ethanollic extract of *Areca catechu* seeds inhibit proliferation and induce apoptosis on MCF-7 cells

Edy Meiyanto ^{1*)}, Ratna Asmah Susidarti ¹⁾, Sri Handayani ¹⁾ dan Fitria Rahmi ²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²⁾ Badan POM-Jakarta

Abstrak

Biji pinang dikenal mengandung senyawa antioksidan sehingga berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek penghambatan ekstrak etanolik biji pinang (EP) terhadap pertumbuhan sel kanker payudara, MCF-7. Standardisasi ekstrak etanolik biji buah *Areca catechu* (EP) dilakukan sesuai standar BPOM. Ekstraksi serbuk biji buah *Areca catechu* dilakukan dengan menggunakan etanol 96%. Pengamatan sitotoksik untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dan penghambatan proliferasi sel (menggunakan uji *doubling time*) dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Pengamatan dan pemeriksaan apoptosis dilakukan dengan pengecatan akridin oranye-etidium bromida (*double staining*). Hasilnya menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanolik biji buah *Areca catechu* (25-100 µg/mL) selama 48 jam menghambat pertumbuhan sel sebesar 13-84% (IC₅₀ 77 µg/mL), sedangkan perlakuan arekolin (10-500 µg/mL) menghasilkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 8-73% (IC₅₀ 180 µg/mL). Ekstrak tersebut juga mampu menurunkan proliferasi sel serta memacu apoptosis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji buah *Areca catechu* (EP) memiliki efek antiproliferatif dengan menghambat pertumbuhan dan memacu apoptosis.

Kata kunci: MCF-7, *Areca catechu*, antiproliferatif

Abstract

Areca catechu seed contains antioxydant substances, supposed to have anticancer property. This research therefore addressed to examine the inhibitory effect of *Areca catechu* seed ethanollic extract (EP) on proliferating breast cancer cells, MCF-7. *Areca catechu* seed ethanollic extract (EP) standardization was done according to the standard of BPOM. *Areca catechu* seed powder extraction was done using ethanol 96%. Cytotoxic assay – to get the value of IC₅₀ and to prevent the cell proliferation (using doubling time assay) – was carried out by using MTT assay. Apoptosis observation was done by acrydine orange- etidium bromide staining method (*double staining*). The result showed that treatment with *Areca catechu* seed ethanollic extract (25-100 µg/m) for 48 h caused 13-84% growth inhibition (IC₅₀ 77 µg/mL) of the cells, while arecoline (ARE) treatment (10-500 µg/mL) showed 8-73% inhibition (IC₅₀ 180 µg/mL). The extract also inhibited cell proliferation and induced apoptosis. These results conclude that *Areca catechu* seed ethanollic extract (EP) possesses antiproliferative effect through growth inhibition and apoptosis induction.

Key words: MCF-7, *Areca catechu*, antiproliferative

Pendahuluan

Penanganan kanker dengan agen kemoterapi masih menjadi pilihan dalam pengobatan kanker. Namun adanya mekanisme *multidrug resistance* (MDR) mengakibatkan berkurangnya efikasi obat kemoterapi (Conze *et al.*, 2001). Beberapa penelitian mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen kemoprevensi yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Tujuannya adalah untuk meningkatkan sensitifitas sel kanker serta mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi. Agen kemoprevensi yang dimaksud disini umumnya memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan tumor melalui mekanisme *cell cycle arrest* (Saphiro and Harper, 1999), pemacuan apoptosis (Fisher, 1994) ataupun menghambat ekspresi protein yang berperan dalam *Multi Drug Resistance* (Kitagawa, 2006).

Areca catechu merupakan tanaman famili Arecaceae yang berpotensi sebagai antikanker. *Areca catechu* memiliki efek antioksidan dan antimutagenik, astringent, dan obat caceng. Biji buah pinang mengandung alkaloid, seperti Arekolin ($C_8 H_{13} NO_2$), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Ekstrak etanolik biji buah pinang mengandung tanin terkondensasi, tannin terhidrolisis, flavan, dan senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin, minyak menguap dan tidak menguap, serta garam (Wang and Lee, 1996). Ekstrak etanolik biji buah pinang tersebut memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan IC_{50} sebesar $45,4 \mu\text{g/ml}$ (Lee and Choi, 1999). Aktivitas antioksidan berkorelasi positif dengan pencegahan kanker. Ekstrak etanolik tanaman ini tidak menginduksi perubahan kromosom (Wang and Lee, 1996). Berdasarkan data-data tersebut, ekstrak etanolik biji buah pinang diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif pengobatan kemoprevensi dengan menginduksi *cell cycle arrest*, pemacuan apoptosis ataupun menghambat ekspresi protein yang berperan dalam MDR.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik biji buah *Areca catechu* (EP) terhadap sel kanker payudara MCF-7, penghambatan proliferasi sel serta pengamatan mekanisme apoptosis. Hal ini memberi makna penting mengenai potensi EP sebagai agen kemoprevensi secara *in vitro* pada

sel kanker payudara resisten agen kemoterapi (MCF-7). Serangkaian pengujian yang akan dilakukan pada penelitian ini meliputi: standarisasi ekstrak (BPOM, 2000), uji sitotoksik (Mosmann, 1983), uji kinetika proliferasi sel, dan pengamatan apoptosis (Wickenden *et al.*, 2003).

Metodologi

Pembuatan ekstrak etanolik biji buah *Areca catechu* (EP)

Biji buah pinang sebanyak 1 kg dikumpulkan dari BPTO Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Biji buah pinang dicuci bersih, dipotong-potong dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 70°C . Simplisia yang telah kering diserbuk, kemudian diekstraksi dengan Soxhlet dengan penyari etanol 96%. Ekstrak etanol cair yang didapat dikentalkan dengan *rotary evaporator* dan dikeringkan diatas waterbath.

Standarisasi ekstrak (Sesuai dengan protokol BPOM, 2000)

Pengujian dilakukan terhadap parameter non spesifik yang meliputi *penetapan kadar air, penetapan kadar abu*. Pengujian terhadap parameter spesifik meliputi *Identitas Ekstrak, Organoleptik dan Kandungan kimia ekstrak*. Untuk mengetahui profil adanya senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak Kloroform:Metanol (1:3). Deteksi adanya senyawa fenolik dilakukan dengan penyemprotan $FeCl_3$ dan memberikan hasil positif bila bercak mengalami pepadaman pada 254 nm dan fluorosensi pada 366. Deteksi flavonoid dilakukan dengan penyemprotan sitroborat dan memberikan hasil positif bila bercak berfluorosensi kuning kehijauan. Deteksi alkaloid dengan penyemprotan Dragendorf dan memberikan hasil positif apabila muncul bercak merah bata. Arekolin digunakan sebagai standar.

Kultur sel epitel payudara

Sel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel MCF-7 koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas farmasi UGM yang dirawat dan ditumbuhkan pada medium DMEM (Gibco) dengan 10% FBS (Gibco) dan 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco).

Uji sitotoksik

Sel MCF-7 ditanam pada microplate 96 sumuran sehingga diperoleh kepadatan 5×10^3 sel/sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu

medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan EP dan Arekolin hidrobromida (Sigma) pada berbagai konsentrasi dengan co-solvent DMSO (Sigma) dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS (Sigma). Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100µL media kultur dan 10µL MTT (Sigma) 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan HCl 4N-isopropanol (1:100), digoyang di atas shaker selama 10 menit. Serapan dibaca dengan ELISA reader (Benchmark Bio Rad) pada panjang gelombang 595 nm.

Uji kinetika proliferasi sel

Sel MCF-7 ditanam pada microplate 96 sumuran sehingga diperoleh kepadatan 5 x 10³ sel/sumuran dan diinkubasi selama 48 jam. Ekstrak dengan berbagai seri kadar ditambahkan ke dalam sumuran dan dilakukan sampling pada jam ke-1, 6, 12, 24, 48 dan 72. Proliferasi sel diamati dengan metode MTT seperti halnya yang dilakukan pada uji sitotoksik.

Pengamatan apoptosis.

Sel MCF-7 ditanam pada *coverslips* yang dimasukan dalam microplate 24 sumuran sehingga diperoleh kepadatan 3 X 10⁴ sel/sumuran dan diinkubasi sampai 50-60% konfluen. Setelah itu diinkubasi dengan senyawa uji selama 48 jam. Medium diambil, dicuci dengan PBS. *Cover slip* yang memuat sel diangkat, diletakan di atas *object glass* dan ditambahkan 10 µL 1X *Working Solution* etidium bromida-akridin oranye kemudian didiamkan selama 5 menit. Sel segera diamati di bawah mikroskop flouresens (Zeiss MC 80). Sel hidup berfluoresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati berfluoresensi oranye (dengan etidium bromida).

Analisis hasil

Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dan kinetika proliferasi sel dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan uji Anova dilanjutkan uji Tukey menggunakan SPSS 11.5 untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

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

Aktivitas sitotoksik EP dinyatakan dalam IC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel) yang dianalisis dengan analisis probit menggunakan SPSS 11.5.

Hasil Dan Pembahasan

Standardisasi ekstrak

Standardisasi EP dilakukan sesuai acuan Badan POM untuk memastikan ekstrak yang digunakan dalam penelitian telah memenuhi standar. Hasil KLT (Tabel II) menunjukkan bahwa EP tidak mengandung alkaloid arekolin, mengandung senyawa golongan fenolik, dan dimungkinkan mengandung flavonoid. Profil kandungan kimia ekstrak sangat penting karena digunakan sebagai acuan untuk memperkirakan penelusuran mekanisme kerja ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini.

Uji sitotoksik

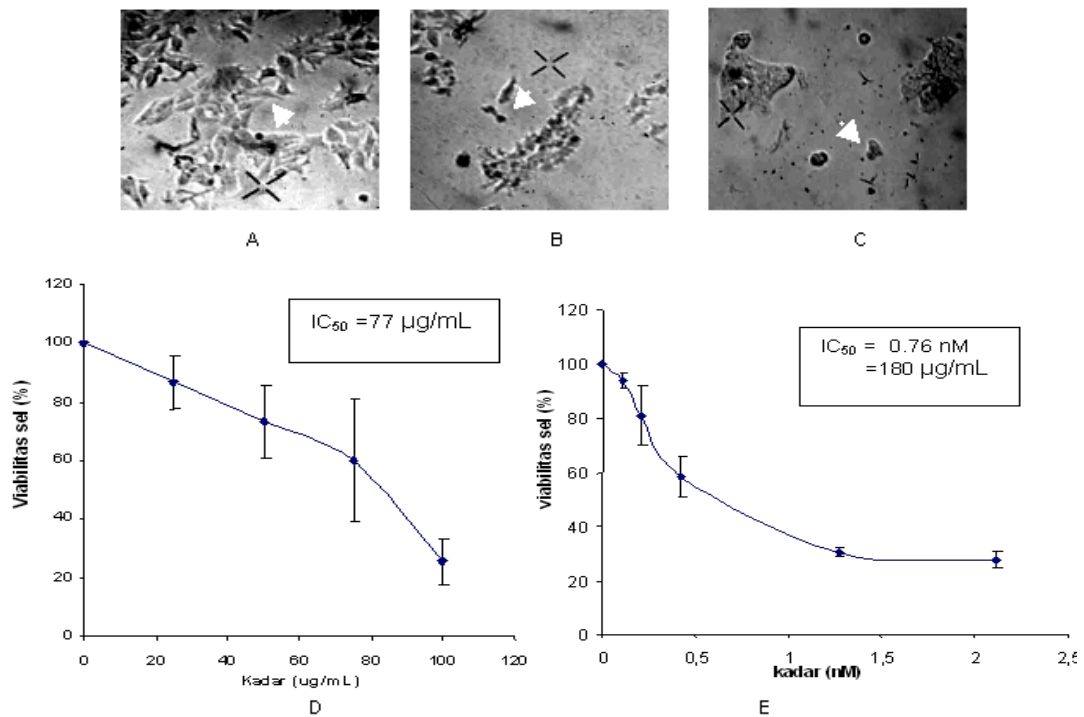
Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel MCF-7 untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan EP dan Arekolin (ARE). Uji ini dilakukan untuk menentukan kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel MCF-7 sampai 50% (IC₅₀). Hasil uji memperlihatkan bahwa kenaikan kadar perlakuan sampel menyebabkan penurunan persentase sel hidup. Pada EP kadar 75 µg/mL dan 100 µg/mL menurunkan persentase sel hidup secara signifikan (P<0.05). Ekstrak pinang memiliki aktifitas penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 dengan IC₅₀ sebesar 77 µg/mL (Gambar 1D). Nilai IC₅₀ dibawah 100 µg/mL menunjukkan adanya potensi ekstrak uji sebagai agen kemoprevensi.

Hasil uji terhadap standar arekolin (sebagai senyawa terbesar pada tanaman *Areca catechu*) juga memperlihatkan penurunan persentase sel hidup dengan adanya kenaikan kadar perlakuan sampel. ARE memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel MCF7 (Gambar 1E) dengan IC₅₀ sebesar 0,76 nM (180 µg/mL). Nilai IC₅₀ ARE lebih besar dari EP, artinya aktivitas ARE lebih rendah dibanding EP.

Tabel I. Parameter standardisasi EP

No	Parameter	Keterangan
1.	Parameter non spesifik	
	Kadar air	12,5%
	Kadar abu	0,70%
2.	Parameter Spesifik	
	Nama ekstrak	Ekstrak etanolik biji buah pinang
	Nama latin tumbuhan	<i>Areca catechu</i> L.
	Bagian yang digunakan	Biji buah pinang
	<i>Organoleptik</i>	berbentuk serbuk kering, berwarna coklat kemerahan, berbau khas dan berasa pahit pedas.
	Kandungan Kimia	Alkaloid Arekolin (-) Fenolik (+) Flavonoid (+/-)

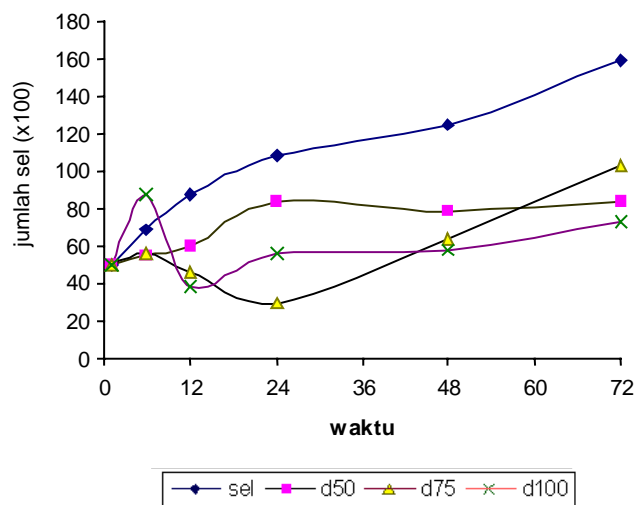
Keterangan: (-) tidak ada, (+) ada, (+/-) kemungkinan ada.



Gambar 1. Efek penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 akibat perlakuan EP dan ARE. Dilakukan dengan menginkubasi 5×10^3 sel MCF-7 dengan EP (25-100 µg/mL) dan ARE (0.1-2.1 nM) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75 µg/mL, C adalah sel dengan perlakuan ARE 150 µg/mL, Grafik D-E secara berurutan merupakan rata-rata viabilitas sel pada berbagai seri kadar EP dan ARE. Perbesaran 100x. → sel kanker yang hidup, → sel yang telah berubah morfologi

Berdasarkan hasil uji sitotoksisitas yang telah dilakukan, EP memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut. Aktivitas sitotoksisitas digunakan sebagai acuan pengembangan penelusuran mekanisme EP dalam menghambat

pertumbuhan sel kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kinetika proliferasi sel dan pengamatan apoptosis untuk mengetahui profil dan mekanisme penghambatan pertumbuhan sel oleh adanya perlakuan EP.



Gambar 2. Efek variasi kadar ekstrak etanolik biji buah pinang terhadap kinetika pertumbuhan sel MCF-7. Hasil uji *doubling time* ekstrak etanolik *Areca catechu* dilakukan dengan menginkubasi sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^3 di dalam sumuran dengan ekstrak etanolik biji pinang (dosis 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dan dilihat absorbansinya pada jam ke-1, 6, 12, 24, 48 dan 72.

Efek antiproliferatif EP

Untuk melihat aktifitas proliferasi sel MCF-7 pada perlakuan ekstrak pinang, maka dilakukan uji *doubling time*. Hasil uji terhadap sel MCF-7 memperlihatkan bahwa perlakuan dengan ekstrak etanolik pinang (50, 75, dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7 (Gambar 2) pada jam ke 24, 48 dan 72 secara signifikan terhadap kontrol ($P < 0,05$).

Berdasarkan profil proliferasi sel, EP mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker bisa melalui *cell cycle arrest*, *cell cycle delay* maupun mekanisme apoptosis. Untuk mengetahui apakah mekanisme penghambatan melalui mekanisme apoptosis, maka dilakukan pengamatan apoptosis.

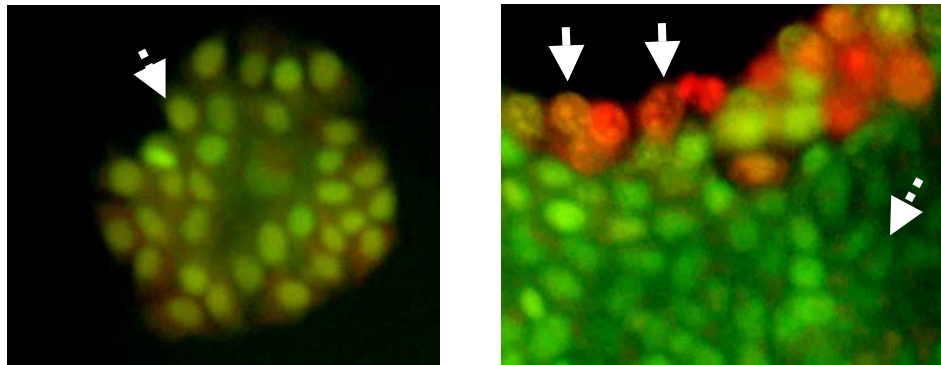
Pengamatan apoptosis

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode *doublestaining* menggunakan *etidium bromide-acrydine orange* (EB-AO). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada kontrol sel hanya terlihat fluoresensi hijau karena hanya menyerap *Acrydine orange*. *Etidium bromide* tidak dapat masuk pada kontrol sel karena integritas sel masih baik. Pada sel dengan perlakuan EP

kadar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagian besar sel berfluoresensi hijau dan ada beberapa yang berfluoresensi oranye. Hal ini menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran pada beberapa sel karena perlakuan EP. Akibatnya *etidium bromide* dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluoresensi oranye sebagai indikator kematian sel. Pada perlakuan EP kadar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dapat dimaklumi bahwa hanya sebagian kecil sel yang berfluoresensi oranye karena kadar yang diujikan dibawah konsentrasi IC_{50} . Selain itu pada sel dengan perlakuan EP juga terlihat adanya fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan EP menyebabkan terjadinya apoptosis (Gambar 3).

Pembahasan

Aktivitas ekstrak etanolik biji buah pinang dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara resisten agen kemoterapi (MCF-7) merupakan hasil yang sangat menarik. Nilai IC_{50} EP kurang dari 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sehingga potensial untuk dikembangkan. Sedangkan nilai IC_{50} ARE sebagai senyawa pembanding lebih tinggi dari EP dan lebih tinggi dari 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selain itu berdasarkan data KLT tidak terdapat



Gambar 3. Efek EP menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 setelah 48 jam perlakuan dengan sampel uji. Pengamatan dilakukan dengan menanam sel MCF-7 sebanyak 5×10^4 sel/sumbuan pada *coverslips* dalam plate 24, dilakukan pewarnaan menggunakan *acrydine orange-ethidium bromide* dan dilihat dengan mikroskop fluoresence. A. kontrol sel, B. EP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Perbesaran 100x, \rightarrow apoptosis, \rightarrow sel hidup.

arekolin dalam EP. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dalam EP bukanlah arekolin.

Berdasarkan uji KLT, EP mengandung senyawa fenolik. Senyawa fenolik yang banyak terdapat di alam diantaranya polifenol dan asam fenolat terutama turunan asam 4-hidroksi benzoat dan asam 4-hidroksisinamat. Asam fenolat berperan dalam mencegah kanker, dan antigenotoksik (Kampa *et al.*, 2003). Senyawa fenolik yang terdapat pada buah blueberry yang terdiri dari asam fenolat, tannin, flavonol, dan antocianin memiliki potensi antiproliferasi dan apoptosis pada sel kanker kolon HT-29 dan Caco-2 (Yi *et al.*, 2005). Berdasarkan penelitian Cakraborty *et al.* (2005) pada mesokarp pinang banyak mengandung senyawa asam 4-hidroksibenzoat. Asam fenolat secara langsung berefek sebagai antiproliferatif karena langsung berinteraksi dengan reseptor aril hidrokarbon, menghambat enzim nitric oxide synthase (NOS) (Kampa *et al.*, 2003). Penghambatan NOS pada sel MCF-7 menginduksi terjadinya apoptosis lewat jalur p53 (Mortensen *et al.*, 1999). Ekstrak etanolik biji buah pinang mengandung tanin terkondensasi, tannin terhidrolisis, flavan, dan senyawa fenolik (Cakraborty *et al.*, 2005; Wang and Lee., 1996), sehingga dimungkinkan memiliki potensi antiproliferasi dan apoptosis.

Berdasarkan pengamatan kinetika proliferasi sel, baik kontrol sel maupun perlakuan EP menunjukkan peningkatan jumlah sel seiring bertambahnya waktu inkubasi

(Gambar 2). Akan tetapi pada jam ke 24, 48 dan 72 secara signifikan jumlah sel pada perlakuan EP lebih sedikit dibandingkan kontrol sel ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa EP mampu mengurangi kecepatan proliferasi sel secara *time dependent*. Hasil *double staining* membuktikan bahwa ekstrak pinang mampu memacu apoptosis sel. MCF-7 merupakan sel kanker yang resisten terhadap agen kemoterapi, *wild type* p53 dan mutasi caspase-3 (Mechetner *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Crawford and Bowen., 2002, Onuki *et al.*, 2003; Prunet *et al.*, 2005). Hal ini mendasari kemungkinan mekanisme penghambatan proliferasi sel setelah adanya perlakuan sampel uji.

Penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis pada MCF-7 bisa melewati jalur *independent* mitokondria, yakni melalui Fas receptor dengan mengaktifkan caspase 8, atau melalui jalur *dependent* mitokondria dengan didahului oleh aktivasi tumor supresor p53 sebagai respon adanya sel stress. Aktivasi p53 akan meningkatkan ekspresi protein proapoptosis (Bad, Bax, Bid) yang memacu pelepasan sitokrom C dari mitokondria. Sitokrom C bersama dengan Apaf-1 akan mengaktifkan caspase 9. Selanjutnya baik caspase 8 maupun caspase 9 akan mengaktifkan caspase 3, 6 atau 7 (Hanahan and Weinberg, 2000; Hakem and Harrington, 2005). Mekanisme apoptosis pada sel MCF-7 tidak melalui aktivasi caspase 3 karena pada MCF-7 caspase 3 telah termutasi, sehingga

dimungkinkan EP menginduksi apoptosis lewat aktivasi caspase 6 atau caspase 7. Untuk ini kiranya masih perlu diteliti lebih lanjut.

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi ekstrak biji pinang sebagai agen antikanker yang dapat menghambat proliferasi sel dan memacu apoptosis. Meskipun aktivitas sitotoksik EP relatif rendah jika dibandingkan dengan agen kemoterapi konvensional seperti doxorubicin, tetapi nilai IC₅₀ EP tersebut cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai agen kemo-prevensi mengingat pada percobaan ini digunakan sel MCF-7 yang diketahui memiliki sifat resistensi yg tinggi terhadap beberapa agen kemoterapi. Pengembangan aplikasinya dapat diarahkan pada efek sinergistik kombinasi EP-Doxorubicin terhadap sel MCF-7. Doxorubicin adalah Agen kemoterapi yang sering digunakan dalam pengobatan kanker payudara tetapi mengalami resistensi pada sel MCF-7. Doxorubicin memiliki beberapa efek samping

diantaranya menyebabkan resistensi dan kardiotoxik sehingga akan beresiko tinggi bila digunakan dalam dosis yang tinggi (Lu and Waxman, 2005). Penggunaan kombinasi yang sinergistik diharapkan dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap doxorubicin.

Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak etanolik buah biji pinang (*Areca catechu*) memiliki aktifitas antiproliferatif terhadap sel MCF-7 dengan menghambat pertumbuhan dan memacu apoptosis.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada DP2M Dirjen DIKTI Departemen Pendidikan Nasional (Hibah Bersaing XV.1 2007) yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- BPOM, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Depkes RI.
- Chakraborty, M., Das, K., Dey, G., and Mitra, A., Unusually high quantity of 4-hydroxybenzoic acid accumulation in cell wall of palm mesocarps, *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 509-513.
- Conze, D., Weiss, L., Regen, P.S., Bhushan, A., Weaver, D., Johnson, P., and Rincon, M., 2001, Autocrine Production Of Interleukin 6 Causes Multi Drug Resistance In Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 61, 8851-8858.
- Crawford, K.W. and Bowen, W.D., 2002, Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines, *Cancer Res.*, 62, 313-322.
- Fisher, D.E., 1994, Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing The Threshold, *Cell*, 78, 539-542.
- Hakem, R., and Harrington, L., 2005, *The Basic Science of Oncology, Cell Death*, McGraw-Hill Medical Companies, 4th Edition, New York, 194-204.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Boskou, D., Gravanis, A., and Castanas, E., 2003, Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action, *Breast Cancer Res*, 6, R63-R74.
- Kitagawa, S., 2006, Inhibitory Effect of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1-6.
- Lee, K.K., and Choi, J.D., 1999, The Effects of Areca Catechu L Extract on Anti-Inflammation and Anti-Melanogenesis, *International Journal of Cosmetic Science* 21, 275-284.
- Lu, H., and Waxman, D.J., 2005, Antitumor Activity of Methoxymorpholinyl Doxorubicin: Potentiation by Cytochrome P450 3A Metabolism, *Mol Pharmacol.*, 67, 212-219.

- Menchetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J., and Fruehauf, J.P., 1998, Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with *in Vitro* Resistance to Taxol and Doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, 4, 389-398.
- Mortensen, K., Skouv, J., Hougaard, D.M., and Larsson, L.I., 1999, Endogenous Endothelial Cell Nitric-oxide Synthase Modulates Apoptosis in Cultured Breast Cancer Cells and Is Transcriptionally Regulated by p53, *J Biol Chem*, 274, 37679-37684.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Onuki, R., Kawasaki, H., Baba, T., and Taira, K., 2003, Analysis of a Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence of a Caspase-3-Dependent Pathway, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 13, :75-82.
- Prunet, C., Lemaire-Ewing, S., Ménétrier, F., Néel, D., and Lizard, G., 2005, Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 β -hydroxycholesterol- induced cell death: A morphological and biochemical study, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 311-326.
- Shapiro, G.I., and Harper, J.W., 1999, Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control, *J. Clin. Invest.*, 104, 1645-1653.
- Wang, C.K., and Lee, W.H., 1996, Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2014 -2019.
- Wickenden, J.A., Clarke, M.C.H., Rossi, A.G., Rahman, I., Faux, S.P., Donaldson, K., and MacNee, W., 2003, Cigarette Smoke Prevents Apoptosis through Inhibition of Caspase Activation and Induces Necrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 29, 562–570.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., and Akoh, C.C., 2005, Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7320 -7329.
- Zhu, J., Nozell, S., Wang, J., Jiang, J., Zhou, W., and Cheng, X., 2001, p73 cooperates with DNA damage agents to induce apoptosis in MCF7 cells in a p53-dependent manner, *Oncogene*, 20, 4050-4057.

* Korespondensi : Dr Edy Meiyanto, M.Si., Apt.
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara Yogyakarta, 55281. Telp. 0274-543120
E-mail: meiyana_e@ugm.ac.id