

Ekstrak Etanolik Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm F.) secara Sinergis Meningkatkan Efektivitas Doxorubicin terhadap Sel Kanker Payudara T47D

(Awar-Awar Leaves Ethanolic Extract Sinergistically Enhances Cytotoxic Effect of Doxorubicin on T47D Breast Cancer Cells)

RATIH HARDIKA PRATAMA, YURISTA GILANG IKHTIARSYAH, ANINDYAJATI, ADITYA FITRIASARI, MUTHI IKAWATI DAN EDY MEIYANTO*

Cancer Chemoprevention Research Center
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 15 Februari 2010, Disetujui 21 Maret 2011

Abstrak: Daun awar-awar (*Ficus septica* Burm F.), yang belum dimanfaatkan secara optimal dalam pengobatan kanker, memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen kombinasi dengan doxorubicin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanolik daun awar-awar (EDA) dan kombinasinya dengan agen kemoterapi doxorubicin (DOX) pada sel kanker payudara T47D. EDA diperoleh dari maserasi serbuk kering daun awar-awar dengan etanol 70%. Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak dilakukan dengan *MTT assay*, baik perlakuan tunggal maupun kombinasinya dengan DOX. Sifat sitotoksik ditentukan dengan nilai IC_{50} , sementara efektivitas kombinasi dihitung dengan nilai indeks kombinasi (CI) untuk menetapkan apakah efeknya sinergis, aditif, atau antagonis. Uji sitotoksik perlakuan EDA tunggal selama 24 jam menunjukkan efek sitotoksik yang potensial dengan IC_{50} sebesar 13 $\mu\text{g/mL}$. Kombinasi EDA-DOX menunjukkan efek sinergis ($CI < 1$) pada konsentrasi EDA 4.88 $\mu\text{g/mL}$ dan DOX 3.75 nM. Hasil ini menunjukkan bahwa EDA memiliki potensi yang menjanjikan untuk diaplikasikan sebagai agen ko-kemoterapi DOX pada terapi kanker payudara.

Kata kunci: ekstrak etanolik daun awar-awar, doxorubicin, kombinasi, sel kanker payudara T47D.

Abstract: Awar-awar leaves which have not been optimally utilized in cancer treatment, are potential to be used in combination with doxorubicin (DOX), an agent used for chemotherapy. The aim of this experiment is to find out cytotoxic effect of awar-awar leaves ethanolic extract (ALE) and its combination with DOX towards breast cancer cells of T47D. ALE was prepared by macerating the dried-leaves powder with ethanol 70%. The cytotoxic effect of ALE toward breast cancer cells was tested employing MTT assay to the treatments both as a single agent and as a combination with doxorubicin (ALE-DOX). The cytotoxicity was determined as IC_{50} value, while effectiveness of combination was measured by combination index (CI) to determine whether the effect is synergic, additive, or antagonistic. Cytotoxic tests on single treatment ALE for a period of 24 hours resulted to a cytotoxic effect with IC_{50} value of 13 $\mu\text{g/mL}$. ALE-DOX combination showed synergistic effect ($CI < 1$) on the concentration of 4.88 $\mu\text{g/mL}$ (ALE) and 3.75 nM (DOX). The results showed that ALE is potential to be used as doxorubicin co-chemotherapeutic agent in breast cancer therapy.

Keywords: awar-awar leaves ethanolic extract, doxorubicin, combination, T47D cells.

PENDAHULUAN

INSIDENSI kanker payudara di Indonesia cukup tinggi. Berdasarkan data sistem informasi rumah sakit (SIRS)

* Penulis korespondensi, HP 08122735092
e-mail: meiyane@ugm.ac.id

2007, kejadian kanker payudara sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen. Penyembuhan penyakit ini tidak mudah karena kanker merupakan penyakit seluler dengan patofisiologi yang kompleks dan melibatkan proses mikroevolusioner⁽¹⁾. Pengobatan utama pada

kanker payudara dilakukan dengan kemoterapi jika pembedahan sudah tidak dapat mengatasi kanker yang telah bermetastasis.

Kemoterapi merupakan langkah pengobatan menggunakan senyawa kimia yang memiliki aktivitas sitotoksik dan bekerja secara langsung pada sel kanker⁽²⁾. Doxorubicin (DOX) adalah agen kemoterapi yang banyak digunakan dalam pengobatan kanker payudara. Namun, penggunaan DOX pada dosis tinggi menimbulkan efek samping yang merugikan, seperti gangguan jantung, mual, diare, dan alopesia sehingga pengobatan kanker menjadi tidak efektif⁽³⁾. Pengurangan dosis dapat mengurangi efek samping DOX⁽⁴⁾. Karena itu, perlu dilakukan kombinasi DOX dengan senyawa kemopreventif lain yang non-toksik atau lebih tidak toksik untuk meningkatkan efikasi kemoterapi dengan menurunkan toksisitasnya pada jaringan normal.

Salah satu agen kemopreventif yang dapat digunakan adalah daun awar-awar. Tanaman ini mengandung alkaloid fenantroindolisidin yang memiliki efek sitotoksik pada sel kanker. Aktivitas sitotoksik komponen fenantroindolisidin menunjukkan nilai poten yang tinggi pada *cell lines carcinoma* KB-VI (*multidrug resistance cell*) dan KB-3-1 (*sensitive cell*). Salah satu komponen fenantroindolisidin, yaitu 6-*O*-desmethylantofine dari *Tylophora tanakae*, mempunyai IC_{50} 7 ± 3 nM untuk sel KB-3-1 dan IC_{50} 10 ± 4 nM untuk sel KB-VI⁽²⁾. Penelitian terhadap aktivitas biologi ekstrak etanolik daun awar-awar (EDA) sebagai agen kemopreventif juga telah banyak dilakukan. Nurcahya⁽⁵⁾ melaporkan bahwa EDA memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC_{50} sebesar 58.58 μ g/mL. Ekstrak etanolik daun awar-awar memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF7 dengan IC_{50} 6 μ g/mL, serta mampu menginduksi apoptosis sel tersebut melalui penekanan ekspresi protein Bcl-2⁽⁶⁾. Uji sitotoksik kombinasi DOX dengan EDA pada sel MCF7 menunjukkan efek yang sinergis dengan indeks kombinasi 0.567⁽⁷⁾.

Beberapa agen kemoterapi dilaporkan efektif baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi untuk pengobatan berbagai jenis kanker. Kombinasi kemoterapi memberikan hasil yang lebih efektif dibandingkan jika diberikan dalam bentuk agen tunggal dan kombinasi yang mengandung DOX lebih efektif dibandingkan dengan regimen lain⁽⁸⁾. Penelitian ini menguji apakah EDA memiliki efek yang sinergis dengan agen kemoterapi DOX sehingga dapat menurunkan dosis efektifnya yang berarti pula mengurangi toksisitasnya pada jaringan normal.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Doxorubicin diperoleh dari Ebewe, PT Ferron

Par Pharmaceutical. Daun awar-awar diperoleh dari daerah Kalasan, Sleman, Yogyakarta. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam ruang terbuka terlindung dari sinar matahari langsung, kemudian dilanjutkan di dalam oven dengan suhu maksimal 70 °C. Daun kering ditimbang dan diblender menjadi serbuk cukup halus. Ekstrak etanolik daun awar-awar diperoleh dengan mengekstraksi serbuk kering daun dengan etanol 70% (Merck). Ekstrak etanol ini dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma). Sel kanker payudara T47D diperoleh dari koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi, UGM. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung *foetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco). Selain bahan-bahan di atas juga digunakan 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) dalam HBSS tanpa Ca^{2+}/Mg^{2+} untuk melepas sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*, PBS tanpa Ca^{2+}/Mg^{2+} untuk mencuci sel dari sisa media.

Bahan uji MTT adalah MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma), dengan konsentrasi 5 mg/mL. *Stopper* yang digunakan adalah SDS 10% dalam 0.1 N HCl. Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti berderajat pro analisis.

METODE. Uji ko-kemoterapi menggunakan metode MTT. Sel T47D dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 (Iwaki) dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 (Heraeus) untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Kemudian media diambil, dicuci PBS, dan ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung DMSO 0,5% v/v saja (kontrol) atau sampel baik dalam bentuk tunggal, yaitu EDA atau DOX saja, maupun kombinasinya. Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Seri konsentrasi EDA yang digunakan adalah 1, 10, 50, 100, 250, 500, dan 750 μ g/mL. Untuk kombinasi digunakan seri konsentrasi EDA 1.63, 3.25, 4.88, 6.5 μ g/mL dan DOX 1.88, 3.75, 5.65, 7.5 nM. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian, ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung MTT 5 mg/mL, diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, reaksi MTT dihentikan dengan stopper SDS 10% dalam 0.1 N HCl, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar di tempat gelap. Kemudian digoyang di atas *shaker* selama 10 menit dan dibaca dengan *ELISA reader* (Biorat) pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Hasil. Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke

dalam persen sel hidup dan dianalisis untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

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

Kemudian dihitung konsentrasi IC_{50} menggunakan metode log probit guna mendapatkan linieritas antara log konsentrasi dan persen sel hidup. IC_{50} adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. IC_{50} dihitung untuk mengetahui konsentrasi non-toksik maksimal.

Sitotoksitas sinergistik ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara agen kemoterapi dan EDA menggunakan persamaan:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

Dimana Dx adalah konsentrasi dari satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek (dalam hal ini adalah IC_{50} terhadap pertumbuhan sel kanker payudara), serta $(D)_1$ dan $(D)_2$ adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama⁽⁹⁾. Interpretasi angka CI atau *Combination Index* yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

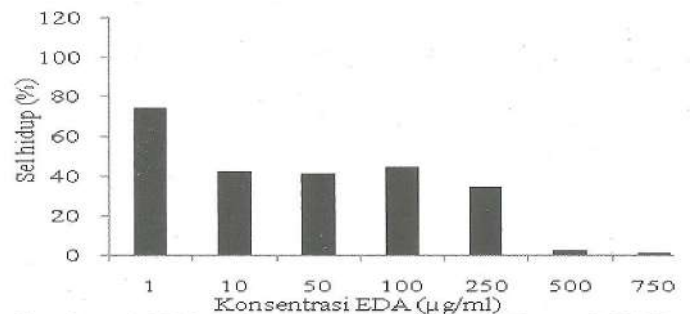
Tabel 1. Nilai indeks kombinasi (CI)⁽¹⁵⁾.

Nilai CI	Sinergisitas
< 0.1	Sinergisitas sangat kuat
0.1 – 0.3	Sinergisitas kuat
0.3 – 0.7	Sinergis
0.7 – 0.9	Sinergisitas sedang
0.9 – 1.1	Hampir aditif
1.1 – 1.45	Antagonis sedang
1.45 – 3.3	Antagonis
> 3.3	Antagonis sangat kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan EDA pada sel kanker payudara T47D dapat menghambat pertumbuhan sel yang bergantung pada dosis (Gambar 1). Perlakuan EDA konsentrasi 1-750 µg/mL selama 24 jam mampu menghambat pertumbuhan sel sebesar 26-99% dengan IC_{50} 13 µg/mL, sementara IC_{50} DOX telah diperoleh dari penelitian sebelumnya, yaitu sebesar 15 nM⁽¹⁰⁾. Data tersebut menunjukkan efikasi EDA dan DOX sebagai agen tunggal.

Efikasi kombinasi EDA dan DOX terhadap pertumbuhan sel T47D dianalisis untuk mengetahui kemungkinan efek kombinasinya, yaitu apakah sinergis, aditif, atau antagonis. Hasil uji menunjukkan bahwa

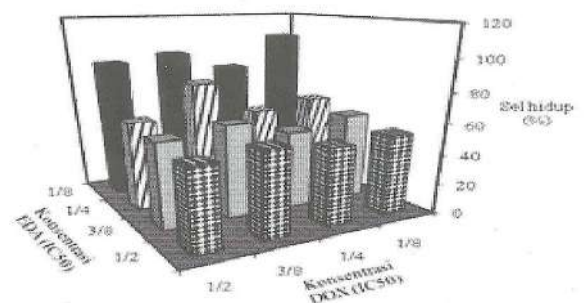


Gambar 1. Efek EDA terhadap pertumbuhan sel T47D. Untuk melihat efikasi EDA sebagai agen tunggal, sebanyak 5000 sel/sumuran ditanam dalam 96-well plate, kemudian diberi perlakuan masing-masing dengan EDA (1-750 µg/mL), diinkubasi selama 24 jam. Dari gambar terlihat bahwa EDA memberikan efek penghambatan pertumbuhan sel yang tergantung dosis. Semakin besar konsentrasi, semakin rendah persentase sel yang hidup.

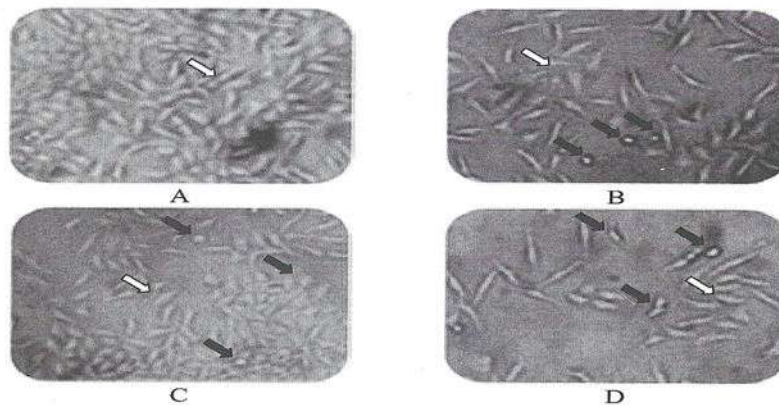
efek sinergis terjadi pada perlakuan kombinasi DOX 3.75 nM dengan EDA 4.88 µg/mL (Tabel 2) yang mampu menghambat pertumbuhan sel T47D sebesar 49% (Gambar 2). Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan perlakuan ekstrak dan doxorubicin pada konsentrasi yang sama ketika diberikan dalam bentuk

Tabel 2. Indeks kombinasi EDA dengan DOX.

EDA (µg/ml)	DOX (nM)			
	1.88	3.75	5.63	7.5
1.63	38.44	5.49	16.49	12.36
3.25	1.259	1.018	7.413	1.424
4.88	1.120	0.703	1.879	1.402
6.5	0.845	0.829	1.443	1.240



Gambar 2. Peningkatan efek penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara T47D oleh kombinasi EDA-DOX. Pengamatan efek kombinasi EDA-DOX terhadap pertumbuhan sel T47D dilakukan sebagaimana yang dijelaskan pada metodologi. Kombinasi EDA dengan DOX menunjukkan bahwa EDA meningkatkan efikasi DOX terhadap sel T47D pada kombinasi EDA 4.88 µg/mL dan DOX 3.75 nM.



Gambar 3. Efek kombinasi EDA dengan DOX terhadap sel T47D. Kontrol sel (A), perlakuan tunggal EDA 4.88 µg/mL (B), perlakuan tunggal DOX 3.75 nM (C), dan perlakuan kombinasi EDA 4.88 µg/mL dengan DOX 3.75 nM (D). Kombinasi EDA dengan DOX meningkatkan penghambatan pertumbuhan sel T47D. Kombinasi EDA 4.88 µg/mL dengan DOX 3.75 nM mampu menghambat pertumbuhan sel T47D sebesar 49%. Penghambatan tersebut lebih besar dibandingkan dengan perlakuan tunggal EDA maupun DOX pada konsentrasi yang sama yaitu secara berurutan masing-masing sebesar 37% dan 0%. Pengamatan dilakukan di bawah inverted microscope, dengan perbesaran 100x. Tanda menunjukkan sel yang hidup sedangkan tanda menunjukkan sel yang mati.

tunggal, yaitu secara berurutan masing-masing sebesar 37% dan 0% (Gambar 3).

Doxorubicin (DOX) merupakan salah satu agen kemoterapi yang secara luas digunakan dalam terapi berbagai jenis kanker. Meski demikian, penggunaannya dalam klinik dibatasi oleh timbulnya efek samping⁽¹¹⁾. Efek samping yang timbul segera setelah pengobatan dengan DOX adalah mual, immunosupresi, dan aritmia yang sifatnya reversibel serta dapat dikendalikan dengan obat-obat lain. Efek samping tersebut dapat dikurangi dengan pengurangan dosis terapi DOX⁽⁴⁾. Dalam penelitian ini, tampak bahwa ekstrak etanolik daun awar-awar (EDA) sinergis dengan DOX, sehingga diharapkan aplikasi ko-kemoterapi EDA dan DOX dapat menurunkan dosis terapi doxorubicin.

Penurunan dosis terapi DOX dapat menurunkan efek sampingnya. Kombinasi EDA dan DOX telah mampu menurunkan salah satu efek samping DOX, yaitu immunosupresi. Ekstrak etanolik daun awar-awar mampu meningkatkan sistem imun pada terapi kanker payudara menggunakan DOX⁽¹²⁾. Dengan demikian, EDA memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen ko-kemoterapi DOX.

Efek sinergistik kombinasi EDA dan DOX tidak lepas dari peran senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak. Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan oleh Mubarak⁽⁷⁾ terhadap EDA mengindikasikan adanya senyawa golongan alkaloid pada EDA. Senyawa aktif dalam daun awar-awar yang memiliki sifat toksik terhadap sel kanker adalah golongan alkaloid fenantroindolisidin⁽¹³⁾. Dengan

demikian, dapat dikatakan bahwa senyawa aktif yang berperan dalam sinergi dari kombinasi EDA-DOX adalah alkaloid fenantroindolisidin.

Mekanisme aksi sitotoksik senyawa golongan alkaloid fenantroindolisidin dalam EDA belum banyak diteliti. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyebutkan bahwa dua dari berbagai jenis alkaloid fenantroindolisidin, pergularine dan tylophorinidine, diketahui menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase yang mungkin merupakan mekanisme antikanker dari alkaloid tersebut⁽¹⁴⁾. Kemungkinan lain dari mekanisme aksi EDA adalah melalui induksi apoptosis. Ekstrak etanolik daun awar-awar mampu menginduksi apoptosis sel MCF7 melalui penekanan ekspresi protein Bcl-2⁽⁶⁾. Dari gambaran tersebut, kemungkinan efek sinergistik EDA-DOX terjadi melalui mekanisme penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis sel T47D.

Selain toksik pada jaringan normal, DOX juga diketahui mampu menyebabkan timbulnya resistensi sel kanker terhadap obat. Berbagai mekanisme yang memperantarainya antara lain inaktivasi obat, pengeluaran obat oleh pompa pada membran sel, mutasi pada target obat, serta kegagalan inisiasi apoptosis^(15,16). Ekspresi berlebihan dari P-gp, suatu transporter membran plasma yang mengantarkan agen kemoterapi keluar dari sel, diduga berperan dalam timbulnya resistensi sel kanker terhadap kemoterapi⁽¹⁷⁾. Seperti halnya paclitaxel, doxorubicin juga merupakan substrat bagi P-gp⁽¹⁵⁾. Senyawa aktif dalam EDA, yaitu alkaloid fenantroindolisidin, diketahui mampu meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap DOX⁽⁷⁾.

Efek sinergistik yang didapat dari hasil uji kombinasi dimungkinkan karena adanya kemampuan kombinasi tersebut untuk mencegah resistensi obat akibat pompa efflux P-gp yang terjadi pada sel kanker payudara.

Sejauh ini, aktivitas EDA maupun golongan alkaloid fenantroindolisidin sebagai inhibitor P-gp belum diteliti secara pasti. Namun, dari hasil sinergi kombinasi, dapat dimungkinkan bahwa EDA dapat menghambat P-gp dalam memompa keluar DOX. Penghambatan P-gp menyebabkan konsentrasi DOX di dalam sel tetap sehingga efikasi kemoterapi DOX meningkat. Dengan demikian, dosis terapi DOX dapat diturunkan melalui kombinasi dengan EDA, namun tetap efektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi EDA meningkatkan efikasi kemoterapi DOX pada sel kanker payudara, sehingga aplikasi DOX dapat diturunkan dosisnya. Hal ini dapat mengurangi efek samping DOX, namun tetap efektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Dengan demikian, EDA dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen ko-kemoterapi DOX.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak etanolik daun awar-awar mampu meningkatkan efikasi kemoterapi doxorubicin pada sel kanker payudara secara sinergis.

DAFTAR PUSTAKA

- King, RJB. Cancer Biology. 2nd Ed. London: Pearson Education Limited; 2000.
- Staerk D, Lykkeberg AK, Christensen J, Budnik BA, Abe F, and Jaroszewski JW. *In vitro* cytotoxic activity of phenanthroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against drug-sensitive and multidrug resistant cancer cells. *J Nat Prod*. 2002. 65:1299-1302.
- Gunawan SG. Farmakologi dan Terapi. Ed ke-5. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2007.
- Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niomsakul, S, and Bauer, JA. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2005; 96:80.
- Nurchaya BM. Efek antiproliferatif ekstrak etanolik daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F.) terhadap sel kanker payudara T47D. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 2007.
- Sekti DA. Aktivitas sitotoksik, induksi apoptosis, dan modulasi ekspresi protein Bcl-2 ekstrak etanolik daun awar-awar (*Ficus Septica* Burm. F.) pada sel kanker payudara MCF7. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 2009.
- Mubarok FM, Sekti DA, Wulandari A, Jenie RI, Septisetyani EP, and Meiyanto E. Peningkatan aktivitas sitotoksik doxorubicin terhadap sel kanker payudara MCF-7 menggunakan ekstrak etanolik daun awar-awar (*Ficus septica* Burm F.). Kongres Ilmiah XVI ISFI. 2008:53.
- Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, Chan DCF, and Agarwal R. Synergistic Anti-cancer effect of grape seed extract and conventional cytotoxic agents against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004. 8:51-62.
- Reynolds CP and Maurer BJ. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods Mol Med*. 2005. 110:173-83.
- Fitriasari A, Junedi S, Hermawan A, Susidarti RA, and Meiyanto E. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by naringenin to increase the cytotoxic activity of doxorubicin on breast cancer cell lines. *The International Conference on Pharmacy and Advance Pharmaceutical Science*. 2009:124.
- Tyagi AK, Agarwal C, Chan DCF, and Agarwal R. Synergistic anti cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 Cells. *Oncology Reports*. 2004. 11:493-9.
- Ikhtiarisyah YG, Ikawati I, Hardika R, Nur WN, Fitriasari A, and Jenie RI. Awar-awar (*Ficus sptica* Burm F.) leaves ethanolic extract increases immune system and gives synergistic effect in combination with doxorubicin on breast cancer therapy. *International Conference on Pharmacy and Advance Pharmaceutical Science*. 2009. 130.
- Wu PL, Rao KV, Su CH, Kuoh CS, Wu TS. Phenanthroindolizidine alkaloids and their cytotoxicity from the leaves of *Ficus septica*. *Heterocycles*. 2002. 57(12):2401-8.
- Rao KN and Venkatachalam SR. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the *in vitro* cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicol In Vitro*. 2000. 14:53-9.
- Davis JM, Navolanic PM, Weinstein-Oppenheimer CR, Steelman LS, Wei H, Konopleva M, Blagosklonny MV, and McCubrey JA. Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clinical Cancer Research*. 2003. 9:1161-70.
- Notarbartolo M, Poma P, Perri D, Dusonchet L, Cervello M, and Alessandro N. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin on human hepatic cancer cell analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letter*. 2005. 224:53-65.
- Kitagawa S. Inhibitory effect of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol Pharm Bull*. 2006. 29(1):1-6.