

Peningkatan Efek Sitotoksik Doxorubicin oleh Naringenin pada Sel Kanker Payudara T47D melalui Induksi Apoptosis

(Increased Cytotoxic Effect of Doxorubicin by Naringenin on T47D Cancer Cells through Apoptosis Induction)

SENDY JUNEDI*, RATNA ASMAH SUSIDARTI, EDY MEIYANTO

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jalan Sekip Utara, Yogyakarta

Diterima 20 November 2009, Disetujui 25 Maret 2010

Abstrak: Doxorubicin masih digunakan sebagai regimen standar kemoterapi kanker payudara, tetapi resistensi terhadap agen ini sering ditemukan, dan penggunaannya dalam jangka waktu lama dapat menimbulkan kardiotoxicitas. Karena itu, agen kombinasi (ko-kemoterapi) perlu dikembangkan untuk meningkatkan efektivitas doxorubicin dan mengurangi toksisitas sistemiknya. Naringenin, salah satu flavonoid yang melimpah di kulit buah jeruk, memiliki efek sitotoksik pada berbagai sel kanker dan mekanismenya melalui jalur selain p53. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek naringenin yang dikombinasikan dengan doxorubicin pada sel T47D, model sel kanker payudara yang resisten terhadap doxorubicin karena memiliki p53 termutasi. Nilai IC_{50} dan CI (*combination index*, indeks kombinasi) ditetapkan dengan uji MTT. Efek pemacuan apoptosis naringenin dan doxorubicin diamati dengan pengecatan DNA menggunakan etidium bromida-akridin oranye. Naringenin dan doxorubicin memberikan efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} masing-masing 509 μ M dan 15 nM. Nilai CI pada berbagai rasio naringenin-doxorubicin menunjukkan efek sinergis (CI = 0,20–0,89). Pada konsentrasi kombinasi naringenin-doxorubicin yang lebih kecil dari 12,5 μ M–0,6 nM dengan rasio 1:1 akan diperoleh efek kombinasi aditif. Perlakuan kombinasi meningkatkan efek apoptosis dari doxorubicin. Penelitian ini menyimpulkan bahwa naringenin berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi bersama doxorubicin, namun tetap dibutuhkan penelusuran mekanisme molekuler lebih lanjut.

Kata kunci: naringenin, doxorubicin, sel T47D, apoptosis.

Abstract: Doxorubicin is one of the standard regimen for breast cancer chemotherapy, but resistance to this agent is often occurred and long period usage will induce cardiotoxicity. Therefore, combination therapy (co-chemotherapy) is needed to improve the efficacy of doxorubicin and to reduce its systemic toxicity. Naringenin is one of the most abundant flavonoids in citrus fruits which showed cytotoxicity in various human cancer cell lines and has mechanisms through pathways except p53. This research is aimed to examine the effect of naringenin in combination with doxorubicin against T47D breast cancer cell which is resistant to doxorubicin due to p53 mutation. The IC_{50} dan CI (combination index) values were determined by the MTT assay. The apoptotic stimulation effect of naringenin and doxorubicin was performed by DNA staining using ethidium bromide-acridine orange. Naringenin and doxorubicin exhibited cytotoxic effect with IC_{50} of 509 μ M and 15 nM, respectively. The CI value in all ratios of naringenin-doxorubicin showed synergistic effect (CI 0.20–0.89). Combination of naringenin-doxorubicin with concentration smaller than 12.5 μ M–0.6 nM in 1:1 ratio exhibited an additive combination effect. The combined treatment increased the apoptotic effect of doxorubicin. These results show that naringenin is potential to be developed as co-chemotherapeutic agent with doxorubicin, although the molecular mechanism is still needed to be explored.

Keywords: naringenin, doxorubicin, T47D cells, apoptosis.

* Penulis korespondensi, Hp. 08122735092
e-mail: meiyana_e@ugm.ac.id

PENDAHULUAN

DOXORUBICIN (Dox) masih merupakan agen kemoterapi utama pada terapi kanker payudara⁽¹⁾ tetapi penggunaannya kurang memuaskan karena menimbulkan efek samping seperti kardiotoxikitas dan resistensi. Resistensi kanker payudara terhadap Dox disebabkan oleh sifat internal kanker itu sendiri atau akibat dari faktor eksternal/perolehan. Karena permasalahan kemoresistensi ini maka pengembangan kemoterapi kanker payudara diarahkan pada terapi kombinasi Dox dengan senyawa lain (ko-kemoterapi) sehingga efektivitas Dox dapat meningkat⁽²⁾.

Naringenin (Nar) merupakan aglikon flavanon yang banyak ditemukan dalam kulit buah jeruk dan telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan sel tumor serta menginduksi apoptosis pada berbagai sel kanker⁽³⁾. Mekanisme induksi apoptosis oleh Nar tidak melalui jalur p53⁽³⁾ melainkan melalui jalur caspase⁽⁴⁾, ER β (*estrogen receptor* β)⁽⁵⁾ dan NF- κ B⁽⁶⁾.

Pada jalur caspase, Nar meningkatkan aktivasi caspase 3, caspase 9, ekspresi Bax, dan menurunkan ekspresi Bcl-2⁽⁷⁾. Aktivitas Nar sebagai antagonis ER α juga dapat mengaktifasi caspase 3 melalui inaktivasi PI3K/Akt, ERK/MAPK dan aktivasi p38/MAPK⁽⁸⁾. Selain memiliki efek sitotoksik tersendiri, Nar juga telah terbukti meningkatkan efek antitumor Dox dengan menghambat aktivitas *Multidrug Resistance-Associated Proteins* (MRPs) pada sel kanker paru A549⁽²⁾ dan mengurangi kardiotoxikitas secara *in vivo* akibat pemberian Dox⁽⁹⁾.

Induksi apoptosis oleh Nar yang independen p53⁽³⁾ diharapkan dapat meningkatkan efek sitotoksik Dox pada sel T47D yang p53nya termutasi sehingga Nar dapat mengatasi permasalahan resistensi internal pada sel T47D. Selain itu, penanganan resistensi internal oleh Nar akan memberikan harapan pencegahan resistensi eksternal akibat pemberian Dox dengan dosis yang meningkat. Penelitian ini akan menguji apakah Nar mempunyai efek sinergis dengan agen kemoterapi Dox sehingga dapat mengatasi permasalahan resistensi karena mutasi p53 dan menurunkan dosis efektifnya yang berarti pula mengurangi toksikitas agen kemoterapi tersebut.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Doxorubicin (Dox) diperoleh dari Ebewe, PT. Ferron Par Pharmaceutical. Naringenin (Nar) diperoleh dari Sigma-Aldrich, USA. Nar dan Dox dilarutkan dengan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma). Sel kanker payudara T47D diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya (*Nara Institute of Science and Technology, Japan*). Kultur sel ditumbuhkan dalam media *Dulbecco's*

modified Eagle's medium (DMEM) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco). Selain bahan-bahan di atas juga digunakan 0,05% trypsin-EDTA (Gibco) untuk melepas sel yang melekat pada flask maupun plate, PBS. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma), dengan konsentrasi 5 mg/mL. *Stopper* yang digunakan adalah natrium dodesil sulfat dalam 0,1 N HCl. Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti derajat pro analisis.

METODE. Uji ko-kemoterapi menggunakan metode MTT. Sel T47D dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Keesokannya, media diambil, dicuci PBS, kemudian ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung sampel baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan berbagai rasio Nar-Dox. Absorbansi tiap sumuran diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

Pengamatan apoptosis menggunakan metode double staining (AE). *Cover slip* yang memuat 5×10^3 sel diberi perlakuan dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 10 μ L pereaksi etidium bromida-akridin oranye (Sigma, USA) (masing-masing 5 μ g/mL dalam PBS). Sel diamati di bawah mikroskop fluoresen.

Analisis Data. Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup. 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 IC₅₀ dengan regresi linier sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. Sitotoksitas sinergistik ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara Dox dan Nar, 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 IC₅₀ terhadap pertumbuhan sel kanker payudara) dan (D)1, (D)2 adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama⁽¹⁰⁾.

Angka CI atau *Combination Index* yang diperoleh diinterpretasikan sebagai berikut:

< 0,1 sinergis sangat kuat
 0,1–0,3 sinergis kuat
 0,3–0,7 sinergis
 0,7–0,9 sinergis ringan-sedang
 0,9–1,1 mendekati aditif
 1,1–1,45 antagonis ringan-sedang
 1,45–3,3 antagonis
 >3,3 antagonis kuat-sangat kuat

Untuk melihat hubungan antara konsentrasi Nar-Dox dan nilai CI maka dibuat grafik hubungan log C vs fraksi kematian sel⁽¹⁰⁾.

Pengamatan apoptosis. Sel berfluoresensi hijau menunjukkan sel hidup, sementara sel berfluoresensi merah menunjukkan sel mati. Sel apoptosis tahap awal akan mengalami fragmentasi nukleus dan masih berfluoresensi hijau dan pada tahap akhir terjadi fragmentasi sel dan fluoresensi merah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

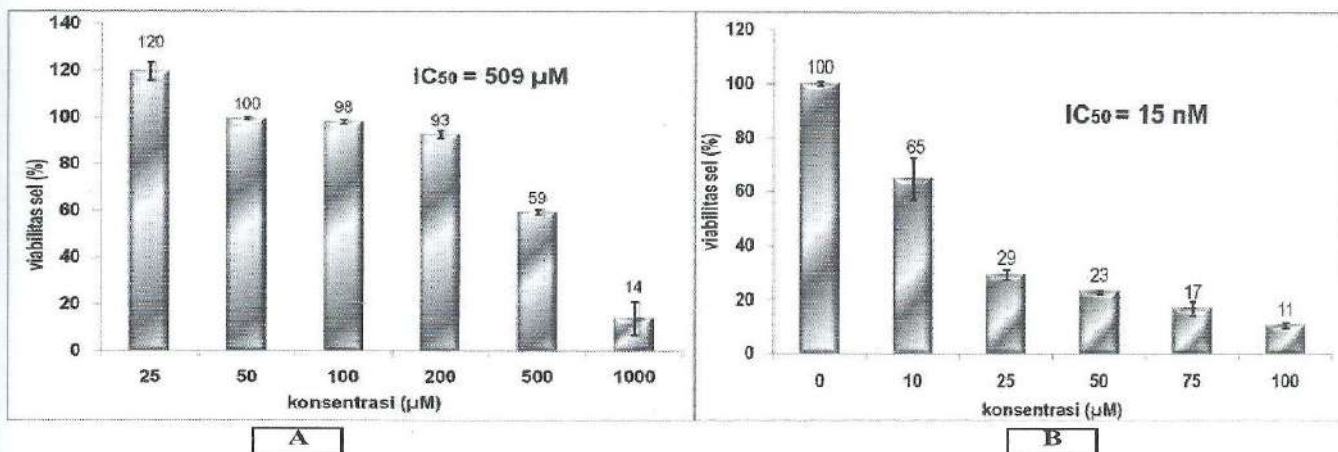
Untuk melihat efikasi Nar dan Dox sebagai agen tunggal pada sel T47D, sel ditanam sebanyak 5000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran, kemudian diberi perlakuan baik dengan (A) Nar (25-1000 μ M) maupun (B) Dox (10-100 nM) (dalam bentuk tunggal), lalu diinkubasi selama 24 jam sebagaimana dijelaskan dalam metodologi. Nar maupun Dox mampu menghambat pertumbuhan sel T47D dengan IC_{50} masing-masing 509 μ M dan 15 nM. Nilai IC_{50} didapat dari perhitungan regresi linier log kadar vs % sel hidup dengan $p < 0,05$.

Nilai IC_{50} untuk Nar adalah 509 μ M, sementara untuk Dox adalah 15 nM (Gambar 1). Agen kemoterapi doxorubicin menunjukkan efek sitotoksik pada sel T47D

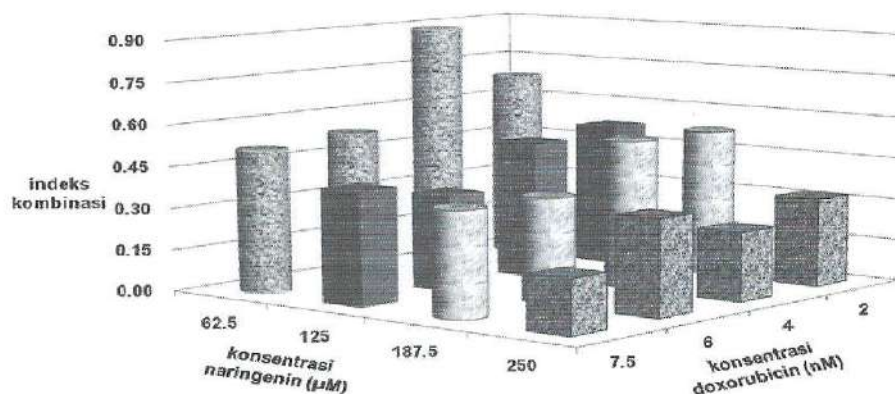
yang lebih tinggi dari Nar tetapi jika dibandingkan dengan sel yang memiliki p53 normal, efek sitotoksik Dox pada sel yang memiliki p53 termutasi seperti sel T47D akan lebih rendah⁽¹¹⁾. Hal ini disebabkan p53 merupakan gen *tumor suppressor* penting yang berperan pada apoptosis dan penghambatan siklus sel.

Efek sitotoksik Nar relatif rendah dengan IC_{50} 509 μ M, tetapi mekanisme molekuler yang telah diteliti menunjukkan bahwa Nar memicu apoptosis secara p53 independen⁽³⁾. Karena itu, Nar menjadi kandidat senyawa yang dapat meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel T47D. Hasil uji sitotoksik kombinasi membuktikan bahwa Nar dapat meningkatkan efek sitotoksik Dox secara sinergis (CI = 0,20–0,89) dengan berbagai rasio (Gambar 2). Jika dilihat dari persamaan regresi log C vs fraksi kematian sel (Gambar 3) yang dikembangkan oleh Chou diketahui bahwa log CI = 0 (aditif) diperoleh saat fraksi kematian sel adalah 0,14. Fraksi kematian sel 0,14 diperoleh pada konsentrasi kombinasi Nar-Dox sebesar 12,5 μ M–0,6 nM. Pada konsentrasi kombinasi Nar-Dox yang lebih kecil dari 12,5 μ M–0,6 nM dengan rasio 1:1 akan diperoleh efek kombinasi aditif dan jika terus dicekalkan konsentrasi kombinasinya maka efek kombinasi tidak akan menjadi antagonis (CI = >1,1). Dalam evaluasi kombinasi, efek yang ideal adalah efek kombinasi sinergis meskipun efek aditif juga memberikan manfaat secara klinis⁽¹⁰⁾. Kemampuan Nar dalam memberikan efek sinergis pada Dox menunjukkan bahwa IC_{50} yang besar dari suatu senyawa tidak selalu berkorelasi dengan efek kombinasi yang rendah.

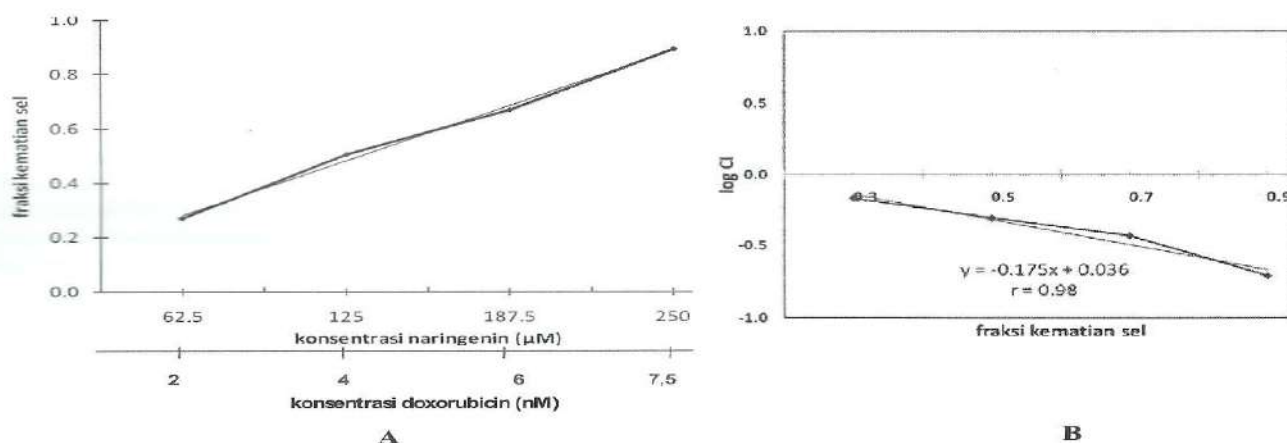
Efek sitotoksik berkorelasi terhadap konsentrasi kombinasi Nar dan Dox pada rasio 1:1, persamaan doxorubicin pada perlakuan kombinasi adalah $y = 0,108x + 0,075$, sementara naringenin pada perlakuan



Gambar 1. Efek penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara T47D oleh Nar dan Dox.



Gambar 2. Peningkatan efek penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara T47D oleh kombinasi Nar-Dox. Pengamatan efek kombinasi Nar(62,5-250 μM)-Dox (2-7,5 nM) terhadap nilai CI.



Gambar 3. Pengaruh kenaikan konsentrasi kombinasi Nar dan Dox terhadap sitotoksitas sel T47D.

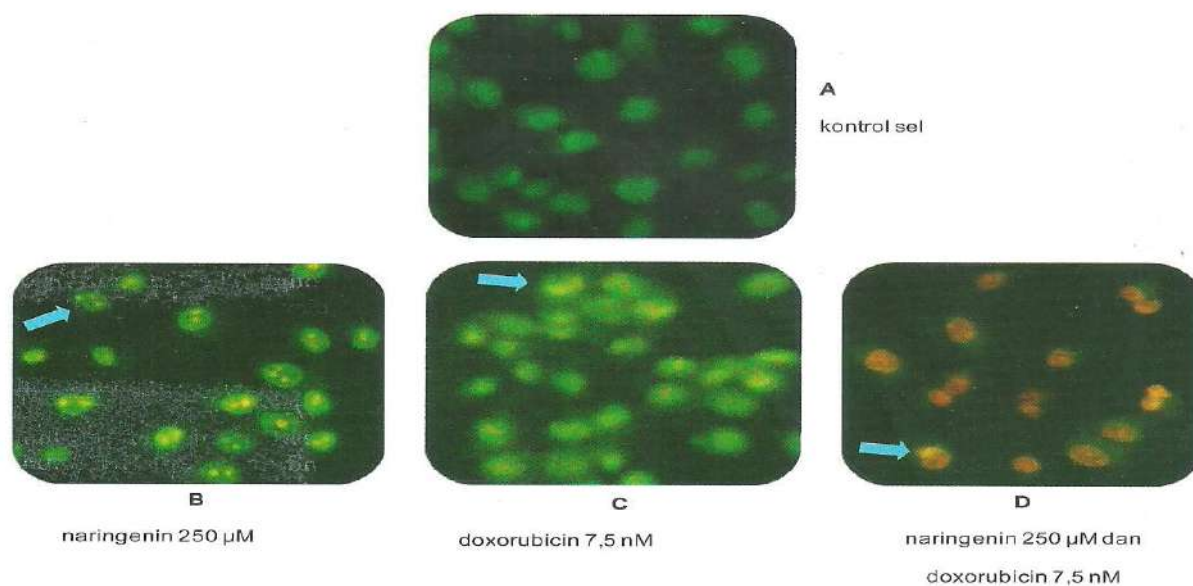
kombinasi adalah $y = 0,0032x + 0,1$, $p < 0,05$ (A). Efek kombinasi dikuantifikasi dengan CI dan ditunjukkan melalui grafik log CI vs fraksi kematian sel (B). Keempat tingkat konsentrasi berefek sinergis dengan log CI < 0 dan menurunnya konsentrasi kombinasi memungkinkan perubahan efek dari sinergis ke aditif yaitu log CI = 0.

Peningkatan efek kombinasi Nar-Dox juga teramati pada analisis apoptosis dengan metode AE. Bertambahnya apoptosis pada perlakuan kombinasi terlihat dari meningkatnya intensitas warna merah yang menunjukkan terjadinya peningkatan permeabilitas membran sel. Selain itu juga muncul banyak badan-badan apoptosis yang semakin menyakinkan bahwa sel mengalami apoptosis (Gambar 4).

Sel ditumbuhkan di atas *cover slip* dan diberi perlakuan sesuai pada petunjuk kemudian dicat dengan

ethidium bromide-acridine orange sebagaimana dijelaskan pada metodologi dan diperiksa di bawah mikroskop fluoresen dengan perbesaran 400 X. Semua sel terlihat masih hidup pada kontrol (A). Perlakuan Nar 250 μM (B) menunjukkan pemacu apoptosis yang hampir sama dengan Dox 7,5 nM (C). Sementara itu, kombinasi Nar dan Dox memperlihatkan pemacu apoptosis jauh lebih tinggi daripada perlakuan tunggal. Tanda panah menunjukkan insidensi apoptosis sel di mana terlihat adanya fragmentasi inti sel.

Nar dapat memacu apoptosis pada sel T47D melalui jalur caspase p53 independen dengan meningkatkan ekspresi Bax dan menurunkan ekspresi Bcl-2⁽⁷⁾ sehingga terjadi aktivasi caspase 9 dan caspase 3⁽⁴⁾. Selain itu, Nar juga berfungsi sebagai antagonis ERα yang ada di sel T47D, menyebabkan PI3K/Akt dan ERK/MAPK inaktif



Gambar 4. Perlakuan naringenin dan doxorubicin memacu apoptosis pada sel T47D. Semua sel masih hidup (A), ada pemacuan apoptosis (B) dan (C), pemacuan apoptosis lebih kuat (D).

sehingga ASK1 tetap aktif memfosforilasi p38/MAPK yang kemudian mengaktivasi caspase 3⁽⁸⁾.

Apoptosis pada sel T47D yang diinduksi oleh doxorubicin kemungkinan terjadi melalui jalur peningkatan ROS (*reactive oxygen species*)⁽¹²⁾ ⁽¹³⁾ dan penghambatan G2/M⁽¹⁴⁾. Penghambatan topoisomerase IIa oleh doxorubicin menyebabkan aktivasi PARP and NAD(P)H oksidase untuk mengoksidasi DNA yang rusak. Reaksi oksidasi ini memunculkan H₂O₂ yang kemudian meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dan pengeluaran sitokrom c yang mengaktivasi caspase 3⁽¹²⁾. Kerusakan DNA untai ganda pada sel dengan status p53 termutasi seperti sel T47D akan menyebabkan penghambatan G2/M yang kemudian diikuti apoptosis⁽¹⁵⁾. Penurunan aktivitas CDK1 pada penghambatan G2/M memicu terjadinya apoptosis⁽¹⁶⁾ dan proses ini tidak dipengaruhi status Bcl-2 dan Bax⁽¹⁵⁾.

Jalur apoptosis Nar dan Dox memiliki perbedaan pada target proteinnya meski pada akhirnya protein-protein tersebut mengaktifkan caspase 3. Karena itu, tidaklah mengherankan jika kedua mekanisme tersebut digabung akan menghasilkan efek sitotoksik sinergis. Dengan melihat kemampuan Nar dalam meningkatkan efek sitotoksik dan apoptosis dari Dox pada sel T47D, maka kombinasi kedua senyawa tersebut memberikan pendekatan baru mengenai pengobatan kanker payudara, terutama kanker dengan resistensi internal akibat termutasinya p53. Selain itu, mengingat kandungan utama kulit buah jeruk adalah naringenin⁽¹⁷⁾, hasil penelitian ini dapat memberikan bukti bahwa kulit buah jeruk yang belum dimanfaatkan memiliki peluang

komersial untuk dikembangkan sebagai sediaan obat antikanker. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Adina dkk.⁽¹⁸⁾ yang menunjukkan bahwa kulit buah jeruk yang banyak mengandung Nar juga memberikan efek sinergis dengan Dox dalam memacu apoptosis sel MCF-7.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa naringenin meningkatkan efektivitas doxorubicin secara sinergis terhadap sel kanker payudara T47D melalui mekanisme apoptosis. Meskipun demikian masih dibutuhkan penelusuran mekanisme molekuler lebih lanjut untuk dapat dikembangkan sebagai agen kokoterapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Universitas Gadjah Mada yang mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Pascasajana tahun 2009. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Tatsuo Takeya (Nara Institute of Science and Technology, Jepang) atas pemberian sel uji untuk keperluan penelitian ini yaitu sel T47D (*human mammary carcinoma cell*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Li X, Lu Y, Liang K, Liu B and Fan Z. Differential Responses to Doxorubicin-Induced Phosphorylation and Activation of Akt in Human Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research*. 2005. 7: R589-97.

2. Zhang FY, Du GJ, Zhang L, Zhang CL, Lu WL, and Liang W. Naringenin Enhances the Anti-Tumor Effect of Doxorubicin Through Selectively Inhibiting the Activity of Multidrug Resistance-Associated Proteins but not P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*. 2009. 26(4):914-24.
3. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, and Ishikawa M. Inhibitory Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice. *Biol Pharm Bull*. 2005. 28(3): 527-30.
4. Jin CY, Park C, Lee JH, Chung KT, Kwon TK, Kim GY, Choi BT, and Choi YH. Naringenin-Induced Apoptosis is Attenuated by Bcl-2 but Restored by the Small Molecule Bcl-2 Inhibitor, HA 14-1, in Human Leukemia U397 Cells. *Toxicology in Vitro*. 2009. 23: 259-65.
5. Totta P, Acconcia F, Leone S, Cardillo I, and Marino M. Mechanisms of Naringenin-Induced Apoptotic Cascade in Cancer Cells: Involvement of Estrogen Receptor Alpha and Beta Signalling. *IUBMB Life*. 2004. 56 (8):491-9.
6. Morikawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, and Hirota K. Naringenin and Hesperetin Induce Growth Arrest, Apoptosis, and Cytoplasmic Fat Deposit in Human Preadipocytes. *J Agric Food Chem*. 2008. 56: 11030-7.
7. Park JH, Jin CY, Lee BK, Kim GY, Choi YH, and Jeong YK. Naringenin Induces Apoptosis Through Downregulation of Akt and Caspase-3 Activation in Human Leukemia THP-1 Cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. 46:3684-90.
8. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, and Marino M. The Nutritional Flavanone Naringenin Triggers Antiestrogenic Effects by Regulating Estrogen Receptor α -Palmitoylation. *Endocrinology*. 2008. 149(5): 2567-75.
9. Arafa HM, Abd-ellah MF, and Hafez HF. Abatement by Naringenin of Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*. 2005. 17(4): 291-300.
10. Reynolds and Maurer. Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models in *Methods in Molecular Medicine*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.;2005. 110: 173-83.
11. Vayssade M, Haddada H, Laurens LF, Tourpin S, Valent A, Benard J, and Ahomadegbe JC. p73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells, *Int J Cancer*. 2005. 116: 860-9.
12. Mizutani H, Oikawa ST, Hiraku Y, Kojima M, and Kawanishi S. Mechanism of Apoptosis Induced by Doxorubicin through The Generation of Hydrogen Peroxide. *Life Sciences*. 2005. 76 (13): 1439-53.
13. Tsang WP, Chau SPY, Kong SK, Fung KP, and Kwok TT. Reactive Oxygen Species Mediate Doxorubicin Induced p53-Independent Apoptosis. *Life Sciences*. 2003. 73(16): 2047-58.
14. Drummond C. The Mechanism of Anti-tumour Activity of the DNA Binding Agent SN 28049 [Thesis]. University of Auckland, New Zealand; 2003. 17-19.
15. Han Z, Chatterjee D, He DM, Early J, Pantazis P, Wyche JH, and Hendrickson EA. Evidence for a G2 Checkpoint in p53-Independent Apoptosis Induction by X-Irradiation. *Molecular and Cellular Biology*. 1995. 15(11): 5849-57.
16. Ongkeko W, Ferguson DJP, Harris HAL, and Norbury C. Inactivation of Cdc2 Increases the Level of Apoptosis Induced by DNA Damage. *Journal of Cell Science*. 1995. 108: 2897-904.
17. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, and Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 2007. 104: 466-79.
18. Adina AB, Handoko FF, Setyarini II, Septisetyani EP, Riyanto S, Meiyanto E. Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle) Meningkatkan Sensitivitas Sel MCF-7 terhadap Doxorubicin. *Proceeding. Kongres Ilmiah ISFI ke-16* Yogyakarta: 2005. ISBN:978-979-95107-6-2.