

ANTICANCER EFFECT OF *Anacardium occidentale* L. LEAF EXTRACT AGAINST BASAL CELL OF ORAL RAT INDUCED 4NQO BY BCL-2 GEN EXPRESSION

EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU METE (*Anacardium occidentale* L.) SEBAGAI ANTIKANKER SEL BASAL RONGGA MULUT TIKUS (*Rattus norvegicus*) DIINDUKSI 4NQO MELALUI EKSPRESI GEN BCL-2

Desy Puspita Sari¹, S.N. Nurul Makiyah²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

²Bagian Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Abstract

Anacardium occidentale L. leaf (AOL) is one of the medicinal plants that can treat various diseases. AOL contains flavonoid that has the potential anticancer. This study aims to investigate the anticancer effect of AOL extract (AOLE) on basal cell carcinoma induced 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) by Bcl-2 gene expression. The kind of this study is experimental quasi with post test only control group design. This study used 24 male Sprague Dawley rat divided into 6 group; (a) Normal rat, (b) 4NQO+aquadest, (c) 4NQO+Doxorubicin 6 mg, (d) 4NQO+AOLE 250 mg, (e) 4NQO+AOLE 300 mg and (f) 4NQO+AOLE 350 mg, rat induced 4NQO for 72 days then get treatment for 14 days. All rat were sacrificed on day 86th, tongue was isolated and preserved using buffer formalin for immunohistochemistry analysis of Bcl-2. The data analyzed with Anova continued Tukey test. The result showed that the AOLE at a dose of 300 and 350 mg have significant difference then Doxorubicin 6 mg and AOLE 250 mg, on this dose of AOLE, it can suppress Bcl-2 gene expression so decreased anti-apoptotic activity. This conclusion is AOLE can decrease antiapoptotic on basal cell carcinoma by Bcl-2 gene expression.

Keyword: Anacardium occidentale L. leaf, oral cancer, basal cell carcinoma, Bcl-2

Abstrak

Daun Jambu Mete (DJM) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit. DJM mengandung Flavonoid yang berpotensi antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antikanker ekstrak etanol daun jambu mete (EEDJM) terhadap sel basal rongga mulut tikus

diinduksi 4 *Nitroquinoline 1-Oxide* (4NQO) melalui ekspresi gen Bcl-2. Jenis penelitian ini adalah kuasi eksperimental dengan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 24 tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan dibagi menjadi 6 kelompok; (a) tikus normal, (b) 4NQO+aquades, (c) 4NQO+Doxorubin 6 mg, (d) 4NQO+EEDJM 250 mg, (e) 4NQO+EEDJM 300 mg dan (f) 4NQO+EEDJM 350 mg, tikus diinduksi 4NQO selama 72 hari kemudian diberi perlakuan selama 14 hari. Seluruh tikus dikorbankan pada hari ke 86 untuk dinekropsi lidahnya kemudian difiksasi ke dalam *buffer* formalin untuk analisis imunohistokimia Bcl-2. Data dianalisis dengan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Tukey Test*. Hasil penelitian menunjukkan EEDJM 300 mg dan 350 mg memiliki perbedaan yang bermakna apabila dibandingkan dengan Doxorubicin 6 mg dan EEDJM 250 mg, pada kadar ini EEDJM dapat menekan ekspresi gen Bcl-2 sehingga terjadi penurunan aktivitas antiapoptosis. EEDJM mempunyai efek antikanker melalui penurunan aktivitas antiapoptosis sel basal rongga mulut tikus akibat pemberian 4NQO melalui ekspresi gen Bcl-2.

Kata Kunci: Daun jambu mete, kanker rongga mulut, karsinoma sel basal, Bcl-2

Pendahuluan

Kanker rongga mulut menempati posisi ketiga setelah kanker leher rahim dan kanker lambung (Sudiono, 2008). Insidensi kanker rongga mulut dalam setiap tahunnya sekitar 275.000 dan hampir 75% terjadi di negara berkembang. Hal itu disebabkan karena kanker rongga mulut mudah menyebar. Bagian rongga mulut yang sering terkena kanker adalah lidah (Sultana *et al.*, 2013). Salah satu jenis kanker rongga mulut adalah karsinoma sel basal (KSB) (Madan, 2010).

Terapi kanker yang dilakukan saat ini ada beberapa jenis diantaranya adalah operasi, terapi radiasi dan kemoterapi. Sampai saat ini kemoterapi, masih dirasakan belum efektif karena sering menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan seperti obat kemoterapi *Doxorubicin* yang mempunyai efektivitas baik, namun bersifat toksis pada jantung (*cardiotoxicity*) (Oliveria *et al.*, 2013).

Salah satu tanaman herbal yang dipercaya dapat menyembuhkan penyakit adalah daun jambu mete (*Anacardium occidentale L*). Ekstrak etanol daun jambu

mete (EEDJM) disinyalir memiliki kemampuan sebagai agen kemopreventif karena kaya akan kandungan senyawa Flavonoid dan Quersetin Glikosida (Oyaesumi *et al.*, 2011; Ajileye *et al.*, 2015).

Proses karsinogenesis saat ini sudah melibatkan aktivitas onkogen dan inaktivasi gen supresor (Singhal *et al.*, 2005). *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) merupakan protein onkogenik yang berperan dalam apoptosis, pentingnya deregulasi apoptosis dalam karsinogenesis dapat dilihat melalui ekspresi protein Bcl-2 (Stancu *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antikanker EEDJM terhadap sel basal rongga mulut tikus (*Rattus norvegicus*) diinduksi 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) melalui ekspresi gen Bcl-2.

Metode Penelitian

Bahan:

Lima puluh tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 5-6 minggu diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu 4 (LPPT 4) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada. Subyek dibagi dalam enam kelompok. Kelompok 1 adalah tikus normal, kelompok 2 adalah tikus diinduksi 4NQO, kelompok 3 adalah tikus diinduksi 4NQO dan diberi Doxorubicin, kelompok 4 adalah tikus diinduksi 4NQO dan diberi EEDJM 250 mg, kelompok 5 adalah tikus diinduksi 4NQO dan diberi EEDJM 300 mg, kelompok 6 adalah tikus diinduksi 4NQO dan diberi EEDJM 350 mg.

Daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L) segar dan tidak berpenyakit diambil secara acak dari satu pohon di Berbah, Sleman, Yogyakarta. Karsinogen 4 *Nitroquinoline 1-Oxide* (4NQO) (PT Biozatik, Singapura) dilarutkan ke dalam *propane-1,2-glycol* (PG) (Sigma Aldrich Chemic GmbH, Germany); EEDJM disuspensi ke dalam ± 1 ml aquades; Imunohistokimia Bcl-2.

Pemeliharaan subjek penelitian

Tikus dipelihara dalam kandang kotak plastik yang ditutup kawat berukuran 45 cm x 30 cm dalam ruangan dengan ventilasi yang cukup dan penerangan 12 jam sehari. Asupan nutrisi berupa pellet AD-II dan air minum berasal dari air kran *ad libitum* diberikan melalui botol minuman kaca.

Pembuatan model karsinogenesis mulut

Model karsinogenesis mulut diperoleh dengan mengaplikasikan 4NQO pada mukosa lidah tikus sebelah dorsal tiga kali seminggu. Karsinogen 4NQO 0,60 mg dilarutkan dalam 1 ml *propane-1,2-glycol* (PG). Aplikasi 4NQO dilakukan dengan kuas no. 2 satu kali usapan setiap kali induksi ($0,15 \pm 0,03$ mg) selama 72 hari. Pemberian *Doxorubicin* dan EEDJM dilakukan tiga kali dalam seminggu melalui intubasi *oral* dengan sonde (kanul bengkok) selama 14 hari. Pengamatan lesi pada rongga mulut dilakukan sehari dalam seminggu untuk memantau keberhasilan lesi pada rongga mulut (Tanaka *et al.*, 2011). Semua perlakuan yang diberikan kepada hewan uji tidak diperlukan anestesi. Subyek hanya ditahan pada

punggung dan tengkuknya sehingga diperoleh akses ke dalam rongga mulut (Agustina *et al.*, 2006).

Nekropsi subjek penelitian

Semua tikus dibius menggunakan eter kemudian dinekropsi lidahnya dengan cara dekapitulasi rahang pada hari ke 86. Selanjutnya dilakukan eksisi lidah dengan hati-hati dan lidah dipotong menjadi dua pada garis tengahnya secara longitudinal (Agustina *et al.*, 2006; McCormick *et al.*, 2015).

Pewarnaan dan pengukuran imunohistokimiawi

Pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini mengacu pada metode *labeled streptavidin biotin* (LSAB) disertai pemanasan dalam *microwave oven* selama sepuluh menit. Penilaian hasil pewarnaan imunohistokimia pada lidah dilakukan pengamatan pada sel basal dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 x sebanyak 5 lapang pandang. Terjadi imunopositif apabila terdapat warna coklat atau merah bata pada sitoplasma sel, kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel imunopositif pada setiap lapang pandang.

Analisis data

Uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas data dengan uji *homogeneity of variance*, jika distribusi data normal dan varian sama, dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA* jika distribusi data tidak normal, dilakukan uji *kruskal wallis*. Nilai p dianggap bermakna jika $p < 0,05$, kemudian dilakukan uji lanjutan dengan uji *Tukey*.

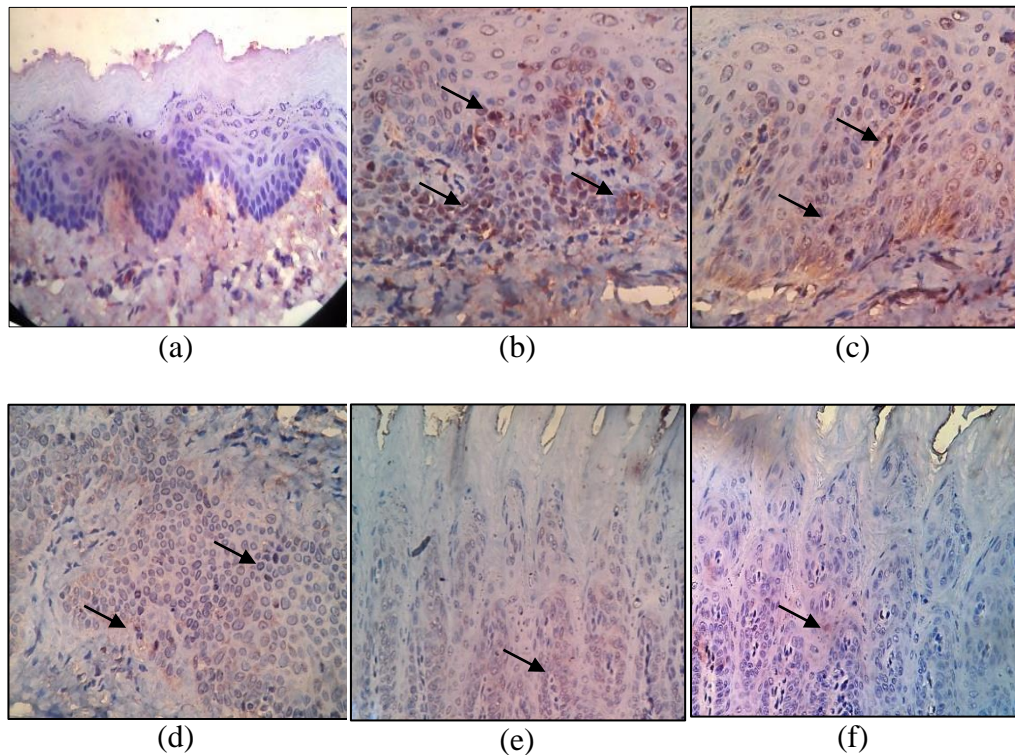
Hasil

Efek antikanker EEDJM terhadap sel basal rongga mulut tikus memberikan hasil berupa penurunan ekspresi gen Bcl-2 seiring dengan peningkatan kadar (Gambar 1, Gambar 2). Hasil pewarnaan imunohistokimia Bcl-2 dapat dilihat dari jumlah sitoplasma sel yang berwarna coklat. Sitoplasma sel yang berwarna coklat terbanyak pada kelompok aquadest dengan rerata sebesar $222,75 \pm 13,02$, sedangkan terendah pada kelompok tikus normal dengan rerata $2,20 \pm 1,47$. Pada kelompok perlakuan, Sitoplasma sel yang berwarna coklat terbanyak pada kelompok Doxorubicin dengan rerata $104,80 \pm 18,00$, sedangkan terendah terdapat pada kelompok EEDJM 350 mg dengan rerata $7,65 \pm 5,14$ (Tabel 1, Gambar 1).

Tabel 1. Rerata sel imunopositif pada lidah tikus diinduksi 4NQO dengan masing-masing perlakuan yang diekspresikan oleh gen Bcl-2 perbesaran 400 x sebanyak lima lapang pandang.

Kelompok	Rerata \pm Standar Deviasi
Normal	$2,20 \pm 1,47$
Aquades	$222,75 \pm 13,02$
Doxorubicin	$104,80 \pm 18,00$
EEDJM 250 mg	$49,10 \pm 11,77$
EEDJM 300 mg	$21,00 \pm 3,03$
EEDJM 350 mg	$7,65 \pm 5,14$

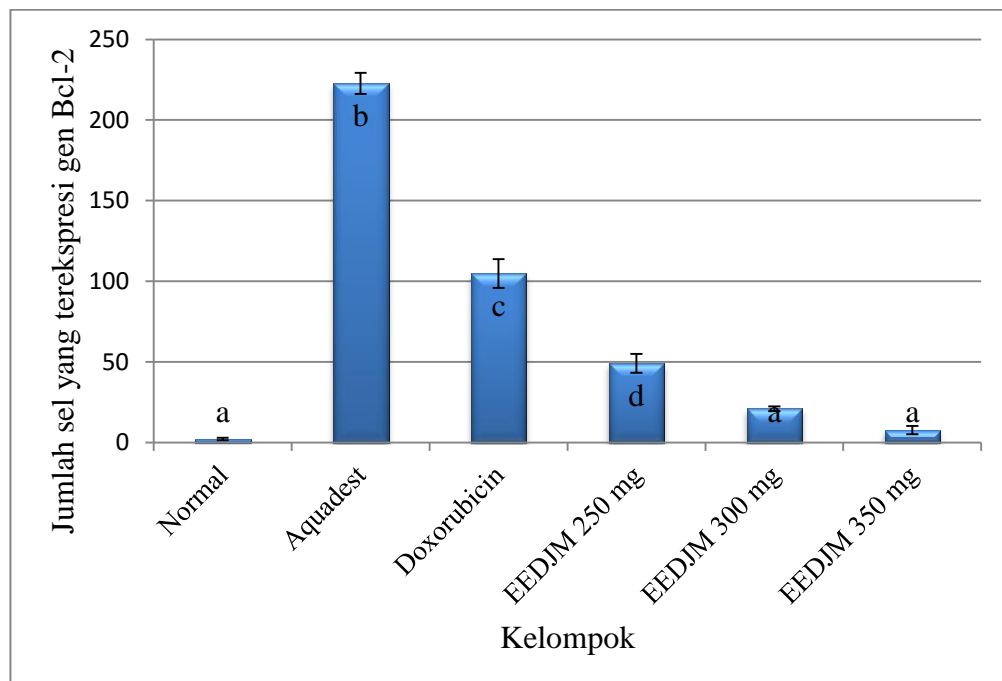
Hasil uji *Shapiro-wilk* menunjukkan bahwa masing-masing kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ artinya dapat disimpulkan bahwa semua data kelompok terdistribusi normal. Hasil uji *homogeneity of variance* menunjukkan bahwa nilai $p (0,052) > 0,05$ artinya data kelompok homogen, dengan demikian data



Gambar 1. Pengamatan lidah tikus menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia Bcl-2 dengan perbesaran 400 x. Kelompok tikus normal (a), kelompok diinduksi 4NQO terdiri dari kelompok kontrol negatif dengan pemberian aquades (b), kelompok kontrol positif dengan pemberian Doxorubicin 6 mg (c), kelompok perlakuan EEDJM 250 mg (d), 300 mg (e) dan 350 mg (f). Sitoplasma sel yang berwarna coklat menunjukkan adanya aktifitas antiapoptosis. Pada kelompok kontrol negatif terlihat banyak sitoplasma sel yang berwarna coklat.

ini termasuk data parametrik yang kemudian dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA untuk melihat perbandingan dari semua kelompok. Berdasarkan analisa data semua kelompok menggunakan *one way ANOVA*, didapatkan hasil nilai $p(0,000) < (0,05)$. Hal ini menunjukkan ada perbedaan yang bermakna untuk semua kelompok. Hasil *Tukey test* pada kelompok kontrol negatif (aquades) dengan kelompok Doxorubicin, EEDJM 250 mg, EEDJM 300 mg dan EEDJM 350 mg terdapat perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa efek antikanker saat diberikan perlakuan lebih efektif

daripada hanya diberikan aquades. Pernyataan tersebut tidak berbeda dengan kelompok Doxorubicin. Pemberian Doxorubicin menunjukkan perubahan yang signifikan apabila dibandingkan kelompok yang diberi aquades, EEDJM 250 mg, EEDJM 300 mg dan EEDJM 350 mg. Begitu pula dengan kelompok EEDJM 250 mg, terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok aquades, Doxorubicin, EEDJM 300 mg dan EEDJM 350 mg. Namun pada kelompok Normal, EEDJM 300 mg dan EEDJM 350 mg tidak terjadi perbedaan yang signifikan di antara ketiga kelompok tersebut (Gambar 2). Hal ini dapat disimpulkan bahwa dosis 300 mg dan 350 mg adalah dosis efektif EEDJM sebagai agen antikanker terhadap sel basal rongga mulut tikus.



Gambar 2. Hasil pengukuran jumlah sel imunopositif pada sel basal rongga mulut tikus. Diagram batang yang diikuti huruf berbeda antar kelompok berarti tidak ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Pembahasan

Pada penelitian ini pemberian EEDJM (250 mg, 300 mg dan 350 mg) terdapat perbedaan signifikan $p (0,005) < 0,05$ bila dibandingkan dengan kelompok aquades. Hal ini menunjukkan bahwa EEDJM memiliki khasiat sebagai agen antikanker terhadap perkembangan sel basal kanker lidah tikus. Pada penelitian ini didapatkan rerata sel imunopositif dengan menggunakan EEDJM pada dosis 250 mg, 300 mg dan 350 mg semakin menurun (dapat dilihat pada gambar 2), hal ini dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi EEDJM maka akan semakin kecil rerata yang diberikan, ekspresi gen Bcl-2 mengalami penurunan sehingga aktifitas antiapoptosis juga mengalami penurunan.

Pemberian Doxorubicin menunjukkan rerata yang tinggi sehingga dapat dijelaskan bahwa pemberian Doxorubicin kurang efektif dibandingkan dengan pemberian EEDJM. Doxorubicin merupakan salah satu agen kemoterapi yang banyak digunakan dalam terapi kanker kepala dan leher, namun penggunaan agen kemoterapi sistemik ini tidak selektif dan sangat toksik bagi jaringan lain yang normal (Wattanapitayakul, 2005). Doxorubicin dapat menyebabkan kardiotoxicitas, efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat irreversibel, sehingga dapat terbentuk kardiomiopati dan *congestive heart failure* (Han *et al.*, 2008). Mekanisme utama toksisitas Doxorubicin terjadi karena pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang merusak makromolekul sel (Minotti *et al.*, 2004). Hal tersebut menyebabkan tikus memiliki kondisi umum semakin memburuk, sehingga tidak dapat menekan aktivitas antiapoptosis pada kelompok pemberian Doxorubicin.

Penelitian lain melaporkan tentang pengaruh EEDJM terhadap aktivitas karsinogenesis. Dalimartha (2000) telah membuktikan keaktifan antikanker senyawa Flavonoid melalui aktivitas sitotoksik terhadap hepatoma pada mencit. Secara umum efek sitotoksik menunjukkan adanya fenomena *dose dependent response* yaitu efek sitotoksik meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan.

Isolasi senyawa daun jambu mete yang diteliti oleh Konan dan Bacchi (2007) dan Arya (1989) menunjukkan bahwa EEDJM mengandung senyawa seperti Flavonoid, Quersetin (Quersetin 3-*O*-rutinosida dan Quersetin 3-*O*-rhamnosida), Amentoflavon, Quersetin Glikosida. Hasil penelitian Ajileye (2015) menunjukkan bahwa senyawa kombinasi Quersetin 3-*O*-rutinosida dan Quersetin 3-*O*-rhamnosida mempunyai kemampuan yang baik untuk menangkal radikal bebas. Selain itu, Flavonoid pada EEDJM mempunyai aktivitas biologi yang sangat menarik, misalnya Cushnie dan Lamb (2005) dan Pegnyemb *et al.* (2005) melaporkan adanya daya antibakteri, Njock *et al.* (2012) melaporkan adanya aktivitas antiinflamatori, Konan *et al.* (2012) dan Njock *et al.* (2012) melaporkan adanya aktivitas antikanker, hepatoprotektif dan antiviral.

Kemampuan EEDJM dalam menghambat perkembangan kanker diduga karena mengandung senyawa Flavonoid dan Quercetin glikosida. Flavonoid merupakan senyawa yang menunjukkan aktivitas sebagai reduktor senyawa hidroksil, superoksida dan peroxy radikal (Soeksmanto, 2010). Penelitian Pebriana *et al.* (2008) secara *in vitro* membuktikan bahwa kandungan Flavonoid dalam ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) dapat memacu

apoptosis pada sel kanker payudara T47D. Hal tersebut diperkuat dengan hasil pengecatan DNA menggunakan *double staining* akridin oranye-etidium bromide yang dilakukan di bawah mikroskop fluoresens, morfologi sel T47D akibat perlakuan ekstrak memiliki bentuk tidak teratur dengan warna oranye tidak seragam yang mengindikasikan sel tersebut mengalami apoptosis.

Flavonoid dapat memicu apoptosis melalui berbagai mekanisme, diantaranya adalah penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signaling pathways*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak serta aktivasi endonuklease (Ren *et al.*, 2003). Quersetin menunjukkan efek sinergis dengan cisplatin secara *in vitro* dan *in vivo* melalui penghambatan PKC (Hofmann *et al.*, 1988 *cit* Middleton dan Kandaswami, 1993). Quersetin juga memiliki kemampuan memacu apoptosis sel kanker kolon Caco-2 dan HT-29 serta sel kanker leukemia HL-60 dengan cara menstimulasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria (Taraphdar, 2001).

Bax, Bak, Bcl-2 dan Bcl-xl adalah keluarga protein Bcl-2. Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 dan Bcl-xl adalah protein antiapoptosis (King, 2000). Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan aktivitas protein Bcl-2 pada penggunaan EEDJM sebagai obat antikanker sel basal lidah tikus. Bcl-2 menghalangi pelepasan sitokrom C karena menempel pada membrane luar mitokondria sedangkan Bcl-xl berikatan dengan Apaf-1 (Nunez *et al.*, 1998). Sitokrom C dan Apaf-1 akan mengaktivasi caspase 9 yang diperlukan dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsic (Saleh *et al.*, 1999). Fungsi bertahan hidup diimbangi dengan fungsi kematian sel yang diperantarai oleh Bax dan Bak.

Membran luar mitokondria dapat berikatan dengan Bax sehingga menginduksi pengeluaran sitokrom c dari mitokondria sedangkan Bcl-xl dapat berikatan dengan Bak sehingga membebaskan Apaf-1 (Nunez *et al.*, 1998). Seiring naiknya ekspresi gen Bax dan Bak maka ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl turun, sehingga akan terjadi regulasi sel ke arah kematian melalui apoptosis.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L) mempunyai efek antikanker terhadap sel basal rongga mulut tikus diinduksi 4NQO melalui penurunan ekspresi gen Bcl-2, maka hal tersebut dapat digunakan sebagai acuan pengobatan herbal menggunakan daun jambu mete.

Kesimpulan

Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (EEDJM) mempunyai efek antikanker terhadap sel basal rongga mulut tikus (*Rattus norvegicus*) diinduksi 4NQO melalui penurunan ekspresi gen Bcl-2. Semakin besar konsentrasi ekstrak, maka semakin besar pengaruhnya dalam penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan konsentrasi EEDJM yang paling berpengaruh adalah 350 mg dan 300 mg.

Daftar Pustaka

- Agustina, D., Haryana, SM. Supartinah, A. 2006. Anticarcinogenesis Effect of *Gynura Procumbens* (Lour) Merr on Tongue Carcinogenesis in 4NQO Induced Rat. *Dental Journal*, 39(3) : 126-132.
- Ajileye, O.O., Obuotor, E.M., Akinkunmi, E.O., Aderogba, M.A. 2015. Isolation and haracterization of Antioxidant and Antimicrobial Compounds from

Anacardium occidentale L. (Anacardiaceae) Leaf Extrat. *Journal of King Saud University – Science*, 4 : 06-09.

Arya, R., Babu, V., Ilyas, M., Nassim, K.T., 1989. Phytochemical Examination of the Leaves of *Anacardium occidentale*. *J. Indian Chem. Soc.*, 66 : 67–68.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 26 : 343–356.

Dalimartha, S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta : Trubus Agriwidia.

Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., and Lou, H., 2008. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 3140-3146.

King, R.J.B. 2000. *Cancer Biology*, 2nd Ed. Pearson Education Limited, London.

Konan, N.A., Bacchi, E.M., 2007. Antiulcerogenic Effect and Acute Toxicity of a Hydroethanolic Extract from the Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Leaves. *J. Ethnopharmacol*, 112 : 237–242.

Konan, N.A., Lincopan, N., Di'az, I.E.C., Jacysyn, J.F., Tiba, M.M.T., Mendes, J.G.P.A., Bacchi, E.M., Spira, B. 2012. Cytotoxicity of Cashew Flavonoids Towards Malignant Cell Lines. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 64 : 435–440.

Madan, V., Lear, J.T., Szeimies, R.M. 2010. Non-melanoma Skin Cancer. *The Lancet*, 375 : 673-85.

McCormick, D.L., Horn, T.L., Johnson, W.D., Steele, V.E., and Lubet, R., Peng, X. 2015. Suppression of Rat Oral Carcinogenesis by Agonist of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ . *Plos One*, 10(10) : 1-15.

Middleton, E.Jr. dan Kandaswami, C. 1993. *The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology : Implications for Immunity, Inflammation and Cancer*, in: Harborne, J.B., *The Flavonoids : Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London.

- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.*, 56 : 185-228.
- Njock, G.B., Bartholomeusz, T.A., Foroozandeh, M., Pegnyemb, D.E., Christen, P., Jeannerat, D., 2012. NASCA-HMBC, a New NMR Methodology for the Resolution of Severely Overlapping Signals: Application to the Study of Agathisflavone. *Phytochem. Anal.*, 23 : 126–130.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., dan Inohara, N. 1998. Caspases: the Proteases of the Apoptotic Pathway. *Onc.*, 17 : 3237–3245.
- Oliveira, S.M., Melo, B.M., Carvalho, L. J., Lavor, S.L.M., Gomes, A.D., de Goes, M.A., Melo, M.M. 2013. Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 5 : 052-057.
- Oyesumi, Oyesina, T., Salihu, A.M. 2011. Histological Effect of Aqueous Extract of *Anacardium occidentale* (Cashew) Stem Bark on Adult Wistar Rat Testis. *J Med Prac and Review*, 2 : 73-77.
- Pebriana, R.B., Wardhani, B.W.K., Widayanti, E., Wijayanti, N.L.S., Wijayanti, T.R., Riyanto, S. dan Meiyanto, E. 2008. Apoptotic Effect of Kenikir Leaves (*Cosmos caudatur* Kunth.) Methanolic Extract on Breast Cancer Cell Line. *Pharmacon*, 9(1) : 21-26.
- Pegnyemb, D.E., Mbing, J.N., de The´odore, A.A., Tih, R.G., Sondengam, B.L., Blond, A., Bodo, B. 2005. Antimicrobial Biflavonoids from the Aerial Parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry*, 66 : 1922–1926.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519–534.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., dan Alnemri, E.S. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated Oligomerization of Apaf-1 Is a Prerequisite for Procaspase-9 Activation, *J. Bio. Chem.*, 274(25) : 1794–1796.
- Singhal, S., Vachani, A., Ozerkis D.A., Kaise, L.R., Albelda, S.M. 2005. Prognostic Implications of Cell Cycle, Apoptosis and Angiogenesis

- Biomarker in non Small Cell Lung Cancer: a review. *Clin cancer Res.*, 11: 3974.
- Soeksmanto, A., Subroto, M.A., Wijaya, H., Simanjuntak, P. 2010. Anticancer Activity Test for Extract of Sarang Semut Plant (*Myrmecodya pendens*) to HeLa and MCM-B2 Cells. *Journal of Biological Science*, 13(3) : 148-151.
- Stancu, M., King, T., Maizel, A. 2002. Molecular biology of lung cancer. In: Weitberg AB, Klastersky J editors. *Cancer of the lung*. New Jersey, Humana Press. p. 81-101.
- Sudiono, J. 2008. *Pemeriksaan Patologi untuk Diagnosis Neoplasma Mulut*. Cet.1.Jakarta : EGC.
- Sultana, J., Bashar, A., Molla, M.R. 2013. New Management Strategies of Oral Tongue Cancer in Bangladesh. *J Maxillofac Oral Sur.*, 10 : 1-7.
- Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: a Review. *Patholog Res Int*, 2011;2011;431246; doi: 10.4061/2011/431246 PMID: 21660266.
- Taraphdar, Amit, K., Madhumita, Roy, dan Bhattacharya, R.K. 2001, Natural Products as Inducers of Apoptosis : Implication for Cancer Therapy and Prevention. *Current Science*, 80(11) : 1391.
- Wattanapitayakul S.K, L Chularojmontri, A Herunsalee, Charuchongkolwongse, S. Niumsakul, J.A. Bauer. 2005. Screening Plants for Cardioprotective Effect against Doxorubicin Toxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96 : 80.