

Local Propolis Extract Has Cytotoxic and Antiproliferative Effect On HeLa Cells

Ekstrak Propolis Lokal Mempunyai Efek Sitotoksik dan Antiproliferatif Terhadap Sel HeLa

Zauhani Kusnul Hadiyah*, Sri Widyarti**, Muhamad Aris Widodo***

*Akademi Keperawatan Bahrul Ulum Jombang

**Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas MIPA/Biologi Universitas Brawijaya

***Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Propolis is resin with complex chemical composition that collected by honeybees from various plants. It has been known that propolis has several biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory activities. The aim of this study is to evaluate the propolis's cytotoxic and antiproliferative activity in vitro on hela cell line. These cells were incubated with different concentrations of propolis (5, 10, 25, 50, and 100 µg/ml) for different time periods (6, 24, dan 48 hours), and the number of viable and died cells were analyzed by trypan blue dye exclusion and were counted using hemocytometer. The result of this study showed that the IC50 of local propolis against HeLa cell line is 27,725 µg/ml. It can be concluded that local propolis extract exhibited a cytotoxic and antiproliferatif effect in vitro against HeLa cell line, in a dose- and time dependent.

Key words: propolis, cytotoxic, antiproliferative, HeLa cell line

PENDAHULUAN

Propolis telah lama dikenal dan digunakan sebagai obat tradisional yang memiliki berbagai efek menguntungkan meliputi anti bakteri, anti fungi, anti inflamasi, anti virus, imunostimulator, dan anti kanker(1). Bahkan dalam kitab suci umat Islam (Al-Qur'an), produk lebah ini secara khusus disebut sebagai obat bagi manusia (An-Nahl: 68-69).

Penelitian efek antikanker propolis baik secara *in vivo* maupun *in vitro* telah dilakukan dalam bentuk ekstrak propolis maupun isolasi bahan aktifnya. Diantaranya propolis memperlihatkan efek sitotoksik terhadap sel HEp-2 *in vitro* yang dipengaruhi dosis dan waktu (2). Efek antiproliferasi pada sel tumor diduga merupakan efek sinergis dari unsur-unsur dalam propolis, diantaranya *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) yang merupakan salah satu unsur dalam propolis yang diteliti terkait aktivitas antitumor(3). *Caffeic acid phenethyl ester* memiliki efek yang dipengaruhi dosis terhadap sel glioma C6 dalam menekan jumlah sel hidup sebesar dan meningkatkan proporsi *hypodiploid* DNA sebagai indikasi apoptosis(4). Efek CAPE juga mempengaruhi siklus sel. Setelah inkubasi dengan CAPE selama 24 jam, jumlah persentase sel glioma C6 pada fase G0/G1 meningkat 85% melalui hambatan pada fosforilasi protein retinoblastoma (pRB) (5). Selain CAPE, flavonoid dan derivatnya yang juga merupakan komponen *polyphenol*. Asupan makanan kaya polifenol khususnya flavonoid berkaitan dengan penurunan resiko terjadinya kanker. Beberapa komponen polifenol meregulasi gen penting yang mengontrol proliferasi,

siklus sel, dan apoptosis pada sel kanker(6).

Komposisi propolis sangat bervariasi antar wilayah, apalagi antar negara dengan musim berbeda. Perbedaan ini disebabkan perbedaan jenis tanaman disekitar lebah penghasil propolis. Bahkan di negara dengan perbedaan musim yang ekstrim komposisi propolis di tempat yang sama bisa berbeda pada musim yang berbeda. Fakta diatas menimbulkan ketertarikan untuk mengkaji apakah propolis Indonesia, khususnya produk lebah dari lingkungan flora tropis Jawa Timur (Batu-Malang) memiliki aktifitas sitotoksik dan penurunan proliferasi sel kanker sehingga bisa menjadi alternatif sebagai kandidat pengobatan kanker.

METODE

Penelitian dilakukan dengan desain *post test only-control group design* yang dilakukan di laboratorium secara *in vitro* dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Banyaknya pengulangan pada kelompok perlakuan 3 (tiga) kali untuk lima perlakuan (5, 10, 25, 50 dan 100 µg/ml) dan tiga waktu pengamatan (6, 24, dan 48 jam).

Prosedur Ekstrak Propolis

Sampel ekstrak propolis didapat dari peternakan lebah KUD Batu Malang. Ekstrak propolis diproses dengan cara: 100 gr propolis ditumbuk dan direndam dalam etanol 96% selama 18 jam, Larutan ini disentrifuse dengan 7000 rpm pada suhu 20°C selama 15 menit, supernatan diambil dan disaring. Untuk mengetahui berat kering ekstrak propolis dilakukan pengeringan dengan evaporator kemudian diukur berat keringnya per ml (mg/ml). Untuk perlakuan, propolis dilarutkan pada *Modified Eagle Media* (MEM) hingga didapatkan beberapa konsentrasi berbeda (5, 10, 25, 50 dan 100 µg/ml).

Prosedur Kultur sel HeLa

Stok sel HeLa ditumbuhkan dalam medium MEM (*Modified Eagle Media*) yang diberi penicillin (100U/ml), streptomycin (100U/ml), dan 10% FBS. Diinkubasi pada inkubator dengan CO₂ 5% dan suhu 37°C sampai konfluen. Untuk menghitung jumlah sel perlakuan dilakukan tripsinisasi dan dilakukan penghitungan standart jumlah sel per ml dengan hemocytometer sehingga akan diketahui jumlah sel per ml.

Prosedur Perlakuan

Sel HeLa dengan konsentrasi 1 x 10⁶ sel/ sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 24 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai 70% konfluen. Keesokannya media dibuang, kemudian diganti media yang mengandung ekstrak propolis dalam berbagai konsentrasi (5, 10, 25, 50, dan 100) µg/ml dan diinkubasi selama 6, 24, dan 48 jam.

Uji Sitotoksik (IC₅₀)

Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak propolis terhadap sel HeLa dengan parameter IC₅₀. Uji dilakukan dengan menginkubasi 1.5x10⁶ sel HeLa dengan seri kadar propolis 5, 10, 25, 50, dan 100 µg/ml dan masing-masing diinkubasi selama 6, 24, dan 48 jam. Kematian sel yang terjadi pada masing-masing perlakuan diperiksa dengan pemeriksaan tripan blue, sel mati mengalami kerusakan membran dan menyerap warna biru, kemudian dihitung secara langsung dengan *hemocytometer*. Sel mati akan tampak berwarna biru dengan inti terwarnai(7).

Uji doubling time

Dengan prosedur yang sama seperti uji sitotoksik, jumlah total sel dihitung untuk menentukan waktu yang dibutuhkan sel untuk menjadi berjumlah dua kali lipat. Hasil digambarkan sebagai kurva jumlah sel vs waktu inkubasi(8).

Analisis Data

Untuk menguji apakah ada hubungan antara konsentrasi ekstrak propolis dengan laju kematian dan laju proliferasi sel HeLa, data yang didapat diuji secara statistik dengan uji korelasi spearman SPSS 12.

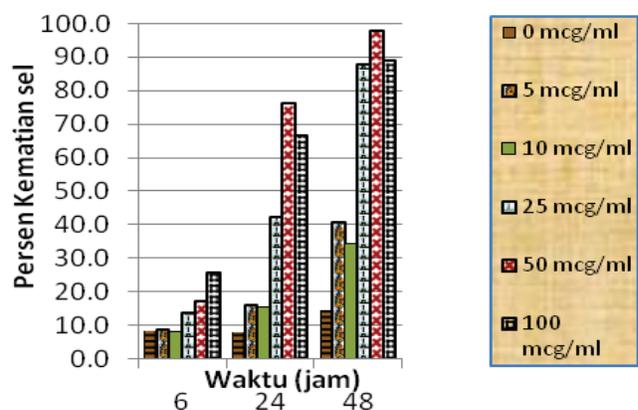
HASIL PENELITIAN

Efek Sitotoksik Ekstrak Propolis terhadap Sel HeLa

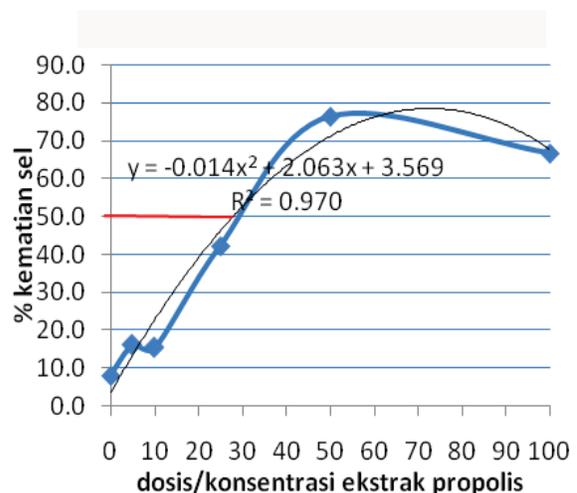
Kematian sel HeLa setelah inkubasi dengan seri ekstrak propolis pada pengamatan jam ke 6, 24, dan 48 jam disajikan dalam bentuk persentase sel mati terhadap total sel. Dari data tersebut tampak bahwa terdapat kecenderungan peningkatan persentase kematian sel seiring dengan peningkatan konsentrasi propolis dan lama inkubasi sel dengan ekstrak propolis. Pada pengamatan jam ke 6 setelah inkubasi persentase kematian tertinggi sebesar 25,5 % terjadi pada sel dengan perlakuan 100 µg/ml. Pada 24 jam setelah perlakuan, peningkatan persentase kematian sel tampak lebih nyata dimana

pada konsentrasi 25 µg/ml kematian sel mencapai 42,2% kemudian meningkat menjadi 76,4 dan 66,8% pada konsentrasi 50 dan 100 µg/ml. Kecenderungan peningkatan persentase kematian sel juga tampak pada pengamatan jam ke 48, dimana persentase kematian sel dengan dosis ekstrak propolis 25, 50, dan 100 µg/ml terus meningkat mencapai angka 97,8%.

Kecenderungan peningkatan persentase kematian sel juga tampak pada pengamatan selanjutnya, pada 48 jam setelah perlakuan, dimana persentase kematian sel dengan konsentrasi 25, 50, dan 100 µg/ml terus meningkat hingga mendekati angka 100%. Sedangkan pada sel dengan perlakuan konsentrasi 5 dan 10 µg/ml, kenaikan prosentase kematian juga terjadi terutama pada 48 jam setelah perlakuan. Grafik peningkatan kematian sel disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Persentase Kematian Sel HeLa setelah Inkubasi dengan Ekstrak Propolis menurut Dosis dan Waktu Inkubasi.

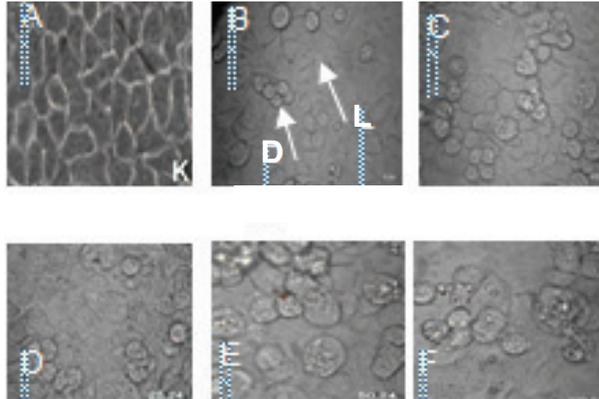


Gambar 2. IC₅₀ Ekstrak Propolis terhadap Sel HeLa.

Data diatas menunjukkan bahwa efek sitotoksik ekstrak propolis terhadap sel HeLa dipengaruhi oleh konsentrasi dan waktu inkubasi. Pada masa inkubasi yang sama peningkatan konsentrasi ekstrak propolis menyebabkan peningkatan persentase kematian sel. Demikian juga pada konsentrasi ekstrak propolis yang sama peningkatan waktu inkubasi sel menyebabkan peningkatan

persentase kematian sel. Kematian sel sebesar 50% tampak dapat dicapai sebelum inkubasi 24 jam dengan perlakuan 50 dan 100 µg/ml propolis, propolis 25 µg/ml menyebabkan kematian setelah jam ke 24.

Dalam grafik persentase kematian sel terhadap konsentrasi (Gambar 2) dapat dilihat bahwa IC₅₀ dapat dicapai pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 25 µg/ml atau lebih, perlakuan dengan 5 dan 10 µg/ml tidak mencapai kematian sel 50%.



Gambar 3. Tampilan Mikroskopis Sel Hela setelah Inkubasi Selama 24 Jam dengan Propolis dibanding dengan Kontrol (L; hidup, D; mati).

Keterangan:

- A. Sel Kontrol (tanpa propolis)
- B. Sel dengan 5 µg/ml propolis
- C. Sel dengan 10 µg/ml propolis
- D. Sel dengan 25 µg/ml propolis
- E. Sel dengan 50 µg/ml propolis
- F. Sel dengan 100 µg/ml propolis

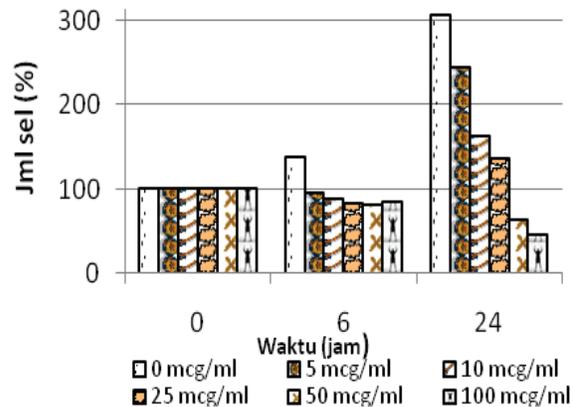
Dari tampilan mikroskopis sel dapat dilihat jelas perubahan yang terjadi pada sel antar perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Sel kontrol tampak berbentuk pipih, memiliki sudut tajam dan menempel di dasar sumuran. Sel dengan perlakuan 5 µg/ml menampakkan adanya sel yang mulai mengalami proses kerusakan/ kematian. Kerusakan sel tampak dari bentuknya yang bulat dan terlepas dari tempat menempelnya di dasar sumuran. Pada kelompok sel dengan perlakuan 10, 25, 50, dan 100 µg/ml tampak sel yang mengalami proses kematian menjadi makin banyak. Adanya hubungan antara konsentrasi dan kematian sel HeLa juga diperkuat dengan hasil uji korelasi spearman's SPSS 12 yang menunjukkan terdapat korelasi positif yang kuat antara konsentrasi perlakuan dengan kematian sel baik pada pengamatan jam ke 6, 24, maupun 48 jam setelah perlakuan dengan koefisien korelasi masing-masing 0,943, 0,886 dan 0,886 dan dengan taraf signifikansi 0,005, 0,019, dan 0,019. Artinya peningkatan konsentrasi ekstrak propolis secara bermakna menyebabkan peningkatan kematian sel HeLa.

Efek Antiproliferatif Ekstak Propolis Terhadap Sel HeLa

Efek pemberian ekstrak propolis terhadap proliferasi sel HeLa diukur dengan menghitung jumlah sel pada tiap kelompok pada akhir masing-

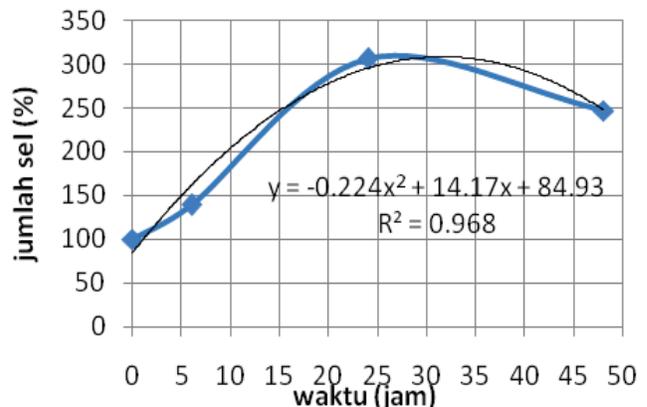
masing lama inkubasi. Data menunjukkan bahwa ekstrak propolis menyebabkan hambatan terhadap proliferasi sel HeLa. Pada pengamatan jam ke 6 setelah perlakuan, sel tanpa propolis mengalami penambahan jumlah menjadi 139% dari jumlah sel semula, sedang sel dengan perlakuan mengalami penurunan jumlah sel namun dalam prosentase yang masih relatif kecil (4-18%).

Pada pengamatan selanjutnya (24 jam setelah pemberian ekstrak propolis) terjadi perbedaan yang cukup ekstrim dimana sel kontrol meningkat pesat menjadi 306% dari sel semula, dan sel dengan ekstrak propolis 5 µg/ml mencapai 245% jml semula. Sel dengan ekstrak propolis 10 dan 25 µg/ml masih mengalami peningkatan jumlah namun keduanya tidak mencapai dua kali lipat jumlah sel semula (164% dan 136%), sedangkan sel dengan perlakuan 50 dan 100 µg/ml justru mengalami penurunan jumlah sel menjadi lebih rendah dari jumlah semula (64% dan 46%).



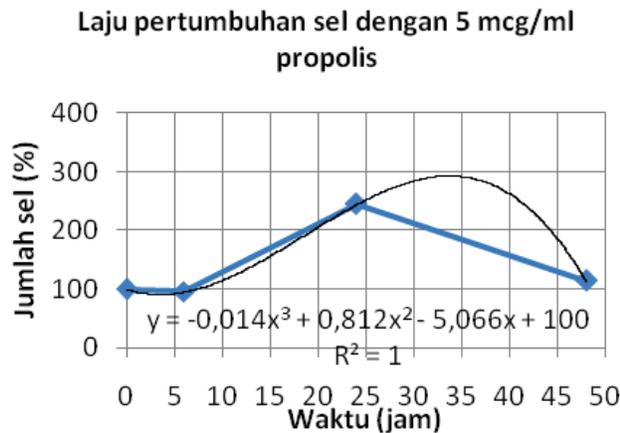
Gambar 4. Pertumbuhan Sel HeLa.

Efek penghambatan yang disebabkan ekstrak propolis terhadap laju proliferasi sel Hela juga dapat diidentifikasi dengan menghitung waktu yang dibutuhkan kelompok sel untuk berkembang menjadi dua kali lipat jumlah semula (*doubling time*). Pada penelitian ini *doubling time* hanya ditemukan pada kelompok sel tanpa ekstrak propolis dan kelompok dengan ekstrak propolis 5 µg/ml (Gambar 4).



Gambar 5. Laju Pertumbuhan Sel Tanpa Ekstrak Propolis.

Gambar 5 menunjukkan nilai $R^2=0,968$ (korelasi kuat) yang signifikan. Dari persamaan dapat ditentukan waktu yang dibutuhkan sel tanpa ekstrak propolis untuk mencapai dua kali lipat adalah $9,57 \pm 0,032$ jam.



Gambar 6. Laju Pertumbuhan Sel dengan Perlakuan 5 μ g/ml Propolis.

Laju pertumbuhan sel pada dosis 5 μ g/ml menunjukkan korelasi sempurna, dengan nilai $R^2=1$ (Gambar 6). Dari persamaan dapat ditentukan waktu yang dibutuhkan sel dengan perlakuan 5 μ g/ml propolis untuk mencapai dua kali lipat adalah 18,9 jam. Waktu yang diperlukan tersebut dua kali lebih lama dibanding sel kontrol.

Hasil uji korelasi *spearman's* antara dosis perlakuan dengan proliferasi sel menampilkan hasil bahwa terdapat korelasi negatif yang kuat dan signifikan. pada pengamatan jam ke 6, 24, maupun 48 jam setelah perlakuan dengan koefisien korelasi masing-masing -0,812, -1, dan -0,943 dan dengan taraf signifikansi 0,05, 0,0, dan 0,005. Artinya peningkatan konsentrasi ekstrak propolis secara bermakna menyebabkan penurunan proliferasi sel HeLa.

DISKUSI

Dalam penelitian ini digunakan propolis produksi lokal daerah Batu dengan tujuan untuk mengeksplorasi dan memperkenalkan potensi yang dimiliki oleh produk lokal yang hingga kini belum banyak dikenal dan diteliti secara ilmiah. Kandungan bahan aktif dalam propolis lokal ini belum diidentifikasi, dan bisa memiliki komposisi yang berbeda dari produk propolis lain. Meskipun demikian penelitian menunjukkan efek yang serupa bisa ditimbulkan oleh propolis dari wilayah geografis yang berbeda dengan kandungan bahan aktif yang berbeda(10).

Sel HeLa digunakan dalam penelitian ini sebagai model yang mewakili karakteristik sel dengan tingkat proliferasi tinggi yang merupakan salah satu karakteristik sel kanker. Hasil penelitian ini diharapkan bisa membuka kemungkinan untuk diaplikasikan ke berbagai sel kanker lain.

Untuk mengidentifikasi sel yang mati digunakan pemeriksaan menggunakan tripan blue.

Pemeriksaan ini didasarkan pada permeabilitas membran, dengan asumsi bahwa sel yang memiliki membran yang permeabel telah mengalami kerusakan yang ireversibel yang artinya sel tersebut mati. Sel yang mati akan menyerap warna biru sehingga dengan pemeriksaan mikroskopis akan tampak biru dengan inti terwarnai lebih gelap.

Pada penelitian ini propolis menampilkan efek sitotoksik terhadap sel HeLa *in vitro* yang dipengaruhi oleh dosis dan waktu. Konsentrasi propolis yang lebih tinggi memerlukan waktu yang lebih singkat untuk menyebabkan kematian sel. Sebaliknya konsentrasi lebih rendah membutuhkan waktu lebih panjang untuk menimbulkan efek yang sama. Hasil ini senada dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bu'falo dkk tahun 2007, tentang efek sitotoksik *Brazilian green propolis* terhadap sel HEP-2 *in vitro*(2).

Titik IC_{50} ekstrak propolis terhadap sel HeLa dalam penelitian ini berada pada konsentrasi $27,725 \pm 0,03$ μ g/ml, menunjukkan aktifitas sitotoksik yang cukup tinggi. Sehingga bisa dikatakan bahwa propolis lokal cukup menjanjikan untuk dikembangkan menjadi bahan yang berpotensi tinggi dalam penanganan penyakit kanker. Penelitian untuk menentukan konsentrasi IC_{50} ekstrak propolis sebelumnya juga pernah dilakukan oleh Chen pada tahun 2004 menggunakan *Taiwanese propolis* terhadap sel *human melanoma*. Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi IC_{50} berkisar 20 μ g/ml. perbedaan ini mungkin disebabkan jenis dan karakteristik sel yang digunakan berbeda. Pada prinsipnya keduanya memiliki potensi efek sitotoksik yang sama baiknya.

Selain memicu kematian sel, aktifitas propolis juga tampak dari hambatannya terhadap perkembangan jumlah sel. Hal ini tampak dari memanjangnya waktu yang dibutuhkan sel dengan perlakuan 5 μ g/ml propolis untuk menjadi dua kali lipat jika dibandingkan dengan kontrol. Sel dengan perlakuan ekstrak konsentrasi lebih tinggi (10, 25, 50, dan 100 μ g/ml) tidak mengalami *doubling time*. Data ini jelas sekali menggambarkan aktifitas antiproliferatif ekstrak propolis terhadap sel HeLa. Aktifitas sitotoksik dan antiproliferatif ekstrak propolis sangat mungkin merupakan hasil kerja sinergis dari bahan-bahan yang terkandung di dalamnya. Beberapa bahan aktif propolis telah diisolasi dan diteliti(3). *Caffeic acid phenethyl ester* merupakan salah satu kandungan bahan aktif dalam propolis yang banyak diteliti terkait aktifitas anti tumor. CAPE adalah kandungan phenol aktif yang ditemukan pada propolis, memiliki berat molekul 284,3 kDa. Selain itu CAPE memiliki efek yang dipengaruhi oleh dosis terhadap sel glioma C6, yaitu menekan jumlah sel hidup 42% dibandingkan dengan kontrol dan meningkatkan proporsi hypodiploid DNA sebagai indikasi apoptosis(4). CAPE juga mempengaruhi siklus sel. Setelah inkubasi dengan CAPE selama 24 jam, jumlah persentase sel glioma C6 pada fase G0/G1 meningkat 85% melalui hambatan pada fosforilasi protein retinoblastoma (pRB).

Phosporilasi pRB oleh *cyclin dependent kinase*(CDK) dipercaya sebagai kejadian penting dalam regulasi memasuki fase S, dan sebagai titik restriksi.

Penghambatan pertumbuhan sel oleh CAPE terkait dengan efek pada proses oksidatif yang diinduksi oleh stimulus mitogen. Pengaturan proliferasi sel pada berbagai jenis tipe sel mamalia dimediasi oleh ikatan sitokin, *growth factor*, dan hormon yang spesifik terhadap reseptor permukaan sel yang selanjutnya menggerakkan oksigen radikal dan H₂O₂. CAPE diketahui mampu menghambat proses oksidatif yang lebih luas atau sebanding dengan agen khemopreventif seperti tamoxifen(11). Flavonoid yang juga merupakan komponen penting dalam propolis menampakkan aktifitas menghambat proliferasi berbagai sel kanker dan pertumbuhan tumor pada berbagai hewan model(12). Menurut Agarwal, flavonoid menunjukkan aktifitas menghambat cyclin B, meningkatkan ekspresi p21 WAF (suatu inhibitor pertumbuhan), dan menginduksi apoptosis. Juga memicu pelepasan sitokrom c ke sitosol, menginduksi procaspase 9, dan mengaktifkan caspase 3(6).

Beberapa komponen polifenol meregulasi gen penting yang mengontrol proliferasi, siklus sel, dan apoptosis pada sel kanker, flavanon menampakkan aktifitas menginduksi apoptosis dengan mengaktifkan caspase 9 dan 3(6). Luteolin, subclass flavone dari flavonoid memiliki potensi antikanker dalam penelitian *in vitro*, luteolin menghambat proliferasi sel HLF tergantung pada konsentrasi dan lama inkubasi, penurunan jumlah sel sebesar 43,6% terjadi dengan pemberian luteolin 10 µmol/L selama 3 hari. 50 µmol/L luteolin menunjukkan induksi apoptosis yang nyata dalam 12 jam(13).

Pada penelitian yang lain, flavonoid aktif, quercetin juga merupakan produk bahan alam yang memiliki aktifitas antitumor dengan menghambat Cdk. Quercetin menampakkan aktifitas antitumor melalui penghambatan siklus sel pada interfase G0/G1, selaras dengan penghambatan Cdk. Analog dengan quercetin, Myricetin juga menampakkan IC₅₀ mendekati 10µM terhadap Cdk2. Flavopiridol menampakkan 100 kali lebih selektif terhadap Cdk dibanding aktifitasnya pada tyrosin kinase, dan merupakan komponen pertama yang diidentifikasi oleh NCI sebagai agen antitumor potensial(14). Flavon, epigenin, dan genistein juga merupakan agen yang potensial untuk kemoprevensi dan terapi kanker dimana ketiganya mampu meningkatkan sitotoksitas TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) pada sel HeLa(15).

KESIMPULAN

Ekstrak propolis lokal memiliki aktifitas meningkatkan kematian dan menghambat proliferasi sel HeLa. Efek tersebut dipengaruhi oleh dosis dan waktu pemberian propolis.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Burdock GA. *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. Food Chem Toxicol. 1998;36:34763.
- Bu'falo C, Joa˜o M. G. Candeias and Jose' Mauricio Sforcin. *In vitro cytotoxic effect of brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells*. Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-000 Botucatu, S.P., Brazil;2007
- Jin UH, Chung TW, Kang SK, et al. *Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification*. Clin Chim Acta. 2005;362:5764.
- Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, Tseng TH. *Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells*. Biochem Pharmacol. 2003;66:22819.
- Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M. *Inhibitory effect of propolis of the growth of human leukemia U937*. Biol Pharm Bull. 2004;27:72730.
- Agarwal, Bharat B, Shishir S. *Molecular targets of dietary agent for prevention and therapy of cancer*. Biochemical Pharmacology. 2006; 71:1397-1421
- Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, Gaspar LFJ, Rocha NS. *Propolis effect in vitro on venereal transmissible canine tumor*. Rev Port Cieˆnc Vet, in press.
- Doyle A, and Griffiths JB. *Cell and tissue culture for medical research*. England: John Willey & Sons LTD; 2000
- Meiyanto E, Ratna A, Handayani S dan Rahmi F. *Ekstrak etanolik biji buah pinang (areca catechu l.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7*. Majalah Farmasi Indonesia. 2008;19:1
- Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. Apidologie. 2000;31:315
- Bhimani HR, Troll, Grunberger D and Frenkel. K. *Inhibition of oxidativc stress in HeLa cells by chemopreventive agents*. Cancer Res. 1993;53: 4528-4533,
- Kanadaswami C, Lee LT, Lee PP et al. *The antitumor activities of flavonoids*. In Vivo. 2005;19:895-909
- Selvendiran K, Hironori K, Takato U, et al. *Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids*. Cancer Res. 2006;66:9
- Cragg GM, Newman DJ. *Ethnopharmacology- Plants as a source of anti-cancer agents. Natural products branch, developmental therapeutics program, division of cancer treatment and diagnosis. National Cancer*

Institute, Maryland. USA; 2005

15. Szliszka E, Czuba ZP, Jernas K and K Wojciech. *Dietary flavonoids sensitize hela cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. Int. J. Mol. Sci. 2008;9:56-64