

# DAYA INHIBISI EKSTRAK KASAR FLAVONOID SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* [Burm. F] Ness) DAN TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria* Roscoe) TERHADAP AKTIVITAS TIROSIN KINASE SECARA *IN VITRO*

Gustini Syahbirin, Dyah Iswantini Pradono, Tri Rahayu

Departemen Kimia, FMIPA, IPB

## ABSTRAK

Berdasarkan hasil uji fitokimia, tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* [Burm. F] Ness) dan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Roscoe) mengandung senyawaan flavonoid. Salah satu manfaat flavonoid ialah sebagai penghambat aktivitas tirosin kinase, enzim yang berperan penting dalam perkembangan sel kanker. Inhibitor spesifik tirosin kinase merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mencari obat antikanker. Daya inhibisi ekstrak kasar sambiloto terhadap tirosin kinase lebih besar daripada kontrol positif, yaitu senyawa genistein (4',5,7-trihidroksiisoflavon), sedangkan daya inhibisi ekstrak kasar flavonoid temu putih lebih rendah.

## PENDAHULUAN

Indonesia kaya dengan tanaman yang berpotensi mencegah maupun mengobati penyebaran sel kanker, antara lain sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dan temu putih (*Curcuma zedoaria* Roscoe). Penelitian yang dilakukan oleh Sukardiman *et al.* (2001) melaporkan bahwa ekstrak metanol tanaman sambiloto mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker leukemia. Kandungan senyawa aktif tanaman ini yang berfungsi sebagai antikanker bahkan telah dipatenkan oleh US patent dengan nomor 6,486,196 (Nanduri *et al.* 2002) dan 6,410,590. Namun, paten tersebut menggunakan sel kanker untuk mengetahui keaktifan senyawa aktif herbal sambiloto. American Institute of Cancer Medical Herbs melaporkan bahwa temu putih mengandung *ribosome inactivating protein* (RIP) yang berfungsi sebagai antikanker, antioksidan, dan anti-peradangan. Temu putih dapat menyembuhkan kanker serviks serta meningkatkan khasiat radioterapi dan kemoterapi guna membunuh sel kanker (Dalimartha 1999).

Tirosin kinase, dikenal juga sebagai tirosilprotein kinase, protein kinase (tirosin), atau gen lck tirosin kinase, merupakan enzim yang berperan dalam transduksi sinyal sel. Aktivitas tirosin kinase sebagai reseptor faktor pertumbuhan dan produk protein onkogen sangat penting bagi perbanyakan sel. Tirosin kinase mengkatalisis transfer gugus fosforusil ujung (gama) dari adenosin trifosfat (ATP) ke tirosin pada substrat protein sehingga mengubah struktur dan fungsi substrat (Voller *et al.* 1986; O'Dwyer & Druker 2000). Reaksi fosforilasi protein tersebut hanya terjadi ketika jumlah ATP dalam sel berlimpah. Protein kinase, akseptor gugus fosforusil, dikelompokkan menjadi 2, yaitu (1) protein kinase serin dan treonin serta (2) protein kinase yang secara spesifik memfosforilasi residu tirosin.

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh peningkatan aktivitas enzim tirosin kinase akibat proses mutasi (Mahlmann 2000). Matter (2002) menyatakan bahwa inhibitor spesifik tirosin kinase merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mencari obat antikanker. Aktivitas tirosin kinase dapat dihambat oleh beberapa senyawa metabolit sekunder, misalnya flavonoid. Botelho *et al.* (1988) menyatakan bahwa flavonoid memiliki kemampuan menghambat reseptor faktor

pertumbuhan epidermal (EGFR) dari tirosin kinase. Senyawaan flavonoid juga diduga berperan dalam menghalangi terjadinya ikatan antara benzo(a)pirena (salah satu penyebab kanker) dan DNA (Le Bon *et al.* 1993).

Dardanela (2005) melaporkan bahwa senyawa polifenol tanaman dapat menghambat aktivitas EGFR. Selain itu, ekstrak kasar flavonoid buah mengkudu, buah mahkota dewa, meniran, dan keladi tikus juga dilaporkan memiliki daya hambat terhadap aktivitas tirosin kinase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif, yaitu genistein. Genistein merupakan senyawa isoflavon pada biji kedelai. Menurut Dixon & Ferreira (2005), genistein mampu menghambat aktivitas sel kanker (kemoprotektan), mengobati penyakit kardiovaskular, serta memiliki aktivitas fitoestrogen. Selain itu, genistein mampu memerangkap radikal bebas molekul oksigen sehingga menghambat pembentukan anion superoksida dari xantin oksidase (Wei *et al.* 1995). Selain, genistein, contoh lain inhibitor alami tirosin kinase ialah daidzein (Challem *et al.* 2002; Rood 1998).

Enzim lain yang selalu terlibat dalam pertumbuhan sel kanker ialah siklooksigenase, khususnya siklooksigenase II dan DNA topoisomerase II. Efek analgesik dan anti-peradangan dari DNA topoisomerase digunakan sebagai target utama dalam penemuan obat antikanker. Inhibitor topoisomerase umumnya memiliki efek stabilisasi lanjutan dari reaksi kovalen topoisomerase, sehingga terlibat dalam pembelahan DNA serta penghancuran sel kanker (Sismindari 2003).

Penelitian ini menggunakan uji inhibisi ekstrak kasar flavonoid tanaman sambiloto dan rimpang temu putih terhadap aktivitas tirosin kinase secara *in vitro*.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Bahan**

Contoh rimpang temu putih pada penelitian ini diperoleh dari kebun tanaman obat Karyasari, Leuwiliang, Bogor, sedangkan contoh tanaman sambiloto didapat dari kebun tanaman obat Pusat Studi Biofarmaka, Bogor. Sementara itu, bahan-bahan kimia yang digunakan ialah pereaksi Mayer, Dragendorf, Wagner, etanol, metanol (MeOH), kloroform, air, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, serbuk logam Mg dan Zn, amil alkohol, eter, anhidrida asam asetat, HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Folin-Ciocalteu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, larva udang, air laut, akuades, asam galat, dan kit untuk uji aktivitas tirosin kinase dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

### **Metode Penelitian**

#### **Ekstraksi flavonoid (Markham 1988)**

Rimpang temu putih dan daun-batang sambiloto dibersihkan dengan air, diiris tipis, dikeringudarkan, dan dikeringkan dengan oven (40–50 °C) selama 4–5 hari. Contoh kering diblender hingga diperoleh serbuk dengan butiran yang cukup halus, dan ditimbang.

Masing-masing serbuk direndam dalam pelarut metanol-air 9:1 (v/v) sebanyak 2 kali. Setelah itu, contoh disaring dan diambil filtratnya. Residunya direndam kembali dengan pelarut metanol-air 1:1 (v/v) sebanyak 1 kali. Kemudian filtrat dan residunya dipisahkan. Setiap maserasi dilakukan selama 2 × 24 jam dengan diaduk teratur. Seluruh filtrat yang terkumpul digabungkan dan dipekatkan. Ekstrak pekatnya lalu dipartisi dengan heksana (teknis) sebanyak 2 kali. Lapisan MeOH-H<sub>2</sub>O dipisahkan dari lapisan heksana dan dipartisi dengan kloroform (p.a.) sebanyak 1 kali. Lapisan MeOH-H<sub>2</sub>O kemudian dipisahkan dari lapisan kloroform. Fraksi-fraksi air-MeOH digabungkan dan diuapkan pelarutnya.

#### **Uji fitokimia (Harborne 1996)**

Uji fitokimia yang dilakukan terhadap kedua contoh, rimpang temu putih dan daun-batang sambiloto, meliputi uji alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, saponin, serta tanin.

### Penentuan total fenol

Sebanyak 5 mg ekstrak kering dilarutkan dalam 2 ml etanol 95%, ditambahkan 5 ml akuades dan 0.5 ml reagen Folin-Ciocalteu 50% (v/v), lalu didiamkan 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (b/v), dihomogenisasi, dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam. Kemudian dihomogenisasi kembali dan diukur serapannya pada panjang gelombang 725 dan 760 nm.

### Penentuan konsentrasi mematikan 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) dengan uji kematian larva udang (BSLT)

Sebanyak 10 ekor larva udang (*Artemia.salina* Leach) dimasukkan ke dalam vial yang berisi air laut lalu ditambahkan larutan ekstrak kasar flavonoid sambiloto dan temu putih sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 1000, 500, 100, dan 10 ppm. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati dari total larva yang dimasukkan ke dalam vial. Data persen mortalitas kumulatif diolah dengan analisis probit  $\text{LC}_{50}$  pada selang kepercayaan 95%. Air laut tanpa penambahan ekstrak digunakan sebagai kontrol.

### Penentuan daya inhibisi ekstrak terhadap aktivitas tirosin kinase

**Pelapisan 96-wells microtiter plate.** Pelapisan dilakukan dengan cara sebagai berikut. Plastik penutup dilepaskan dari tempatnya, kemudian sejumlah sumur yang diperlukan ditempatkan dalam *plate holder*. Contoh larutan stok substrat tirosin kinase (PGT, polimer sintetik acak poli-Glu-Tyr) dicairkan dan sebanyak 125  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam setiap sumur. Kemudian mikrotiter ditutup dan *plate* diinkubasi semalam pada suhu 37 °C. Setelah itu, larutan substrat yang tidak terlapis dibuang dan masing-masing sumur dicuci dengan 200  $\mu\text{l}$  bufer pencuci (PBS-Tween 20). Bufer pencuci ini dibuang dan sumur dikeringkan selama 2 jam pada suhu 37 °C.

**Pengujian protein tirosin kinase (PTK).** Pelarut bufer tirosin kinase (BTK) dengan konsentrasi 1 $\times$  dibuat dengan cara melarutkan BTK konsentrasi 10 $\times$  sebanyak 1 ml ke dalam 9 mL air deionisasi. Selanjutnya, 32.5  $\mu\text{l}$  EGFR (130U) dicairkan, dicampur dengan 292.5  $\mu\text{l}$  BTK (1 $\times$ ) (setiap 10  $\mu\text{l}$  mengandung 4 U), diaduk, dan disimpan dalam es. Larutan stok ATP sebanyak 128  $\mu\text{l}$  juga dilarutkan dengan 3.2 ml BTK (1 $\times$ ), diaduk perlahan, dan disimpan dalam es. Setelah itu, sebanyak 5 vial disiapkan, 1 vial untuk kontrol EGFR, 1 vial untuk genistein (sebagai pembanding), dan 3 vial untuk masing-masing contoh. EGFR sebanyak 20  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam setiap vial, kemudian berturut-turut ditambahkan 20  $\mu\text{l}$  air bebas ion, 20  $\mu\text{l}$  genistein, dan 20  $\mu\text{l}$  contoh.

BTK sebanyak 90  $\mu\text{L}$  (1 $\times$ ) yang mengandung ATP dimasukkan ke dalam masing-masing sumur. Setelah itu, ditambahkan 20  $\mu\text{l}$  larutan contoh yang berisi EGFR (duplo) sehingga tiap sumur mengandung 10  $\mu\text{l}$  sampel dan 10  $\mu\text{l}$  EGFR 4U dengan konsentrasi ATP 0.3 mM. Selanjutnya, sumur-sumur ditutup dan diinkubasi pada suhu kamar. Setelah 30 menit, campuran dikeluarkan dari masing-masing sumur dan sumur dicuci lima kali dengan 200  $\mu\text{l}$  bufer pencuci.

Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  larutan antibodi konjugat (*horse radish peroxidase*, HRP) dimasukkan ke dalam sumur. Sumur ditutup dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah itu, larutan antibodi dikeluarkan dari sumur, dan setiap sumur dicuci dengan 200  $\mu\text{l}$  bufer pencuci sebanyak 5 kali. Substrat (*o*-fenilenadiamina, OPD) sebanyak 100  $\mu\text{l}$  segar ditambahkan pada masing-masing sumur dan diinkubasi selama 7 menit dalam keadaan gelap pada suhu kamar. Larutan substrat peroksidase segar dibuat dengan cara melarutkan satu tablet OPD dan satu tablet urea hidrogen peroksida dalam 20 ml air deionisasi, dicampurkan sampai larut, dan dihindarkan dari cahaya sampai digunakan. Larutan ini tidak untuk disimpan.

Warna jingga-kuning akan muncul dalam sumur yang positif. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.5 N sebagai larutan penghenti pada masing-masing sumur. Setelah 30 menit, umur diukur absorbansya dengan *microplate* ELISA yang ditetapkan pada 490 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen Ekstrak Kasar Flavonoid

Rendemen ekstrak temu putih lebih besar daripada tanaman sambiloto (Tabel 1). Namun, selisihnya tidak terlalu signifikan, yaitu hanya 2.91%. Hal ini dapat disebabkan oleh keberadaan molekul pati dalam rimpang temu putih yang mencapai sekitar 12%. Jumlah gugus hidroksil yang cukup banyak dalam molekul pati menyebabkan pati ikut terekstraksi oleh pelarut yang juga bersifat polar. Ekstrak kasar flavonoid tanaman sambiloto dan temu putih masih berupa pasta walaupun telah dilakukan pengeringan beku selama kira-kira 48 jam.

Tabel 1 Rendemen ekstrak kasar flavonoid rimpang temu putih dan batang-daun sambiloto

Contoh	Rendemen (%)	Wujud
Sambiloto	16.90	Pasta hijau pekat
Temu putih	19.81	Pasta cokelat pekat

### Penapisan Fitokimia

Berdasarkan hasil uji fitokimia (Tabel 2), kandungan metabolit sekunder rimpang temu putih segar dan kering tidak berbeda, yaitu alkaloid, flavonoid glikosida, flavonoid aglikon, saponin, dan terpenoid, sedangkan uji tanin dan steroid memberikan hasil yang negatif. Hasil uji fitokimia kedua jenis contoh daun sambiloto juga menunjukkan kandungan senyawa yang secara kualitatif sama, yaitu alkaloid, flavonoid glikosida, flavonoid aglikon, tanin, dan steroid, tetapi tanpa saponin dan terpenoid. Namun, ekstrak kasar flavonoid tidak memiliki kandungan yang sama dengan contoh segar maupun keringnya. Senyawaan tanin dan alkaloid tidak teridentifikasi dalam ekstrak kasar flavonoid sambiloto, sedangkan ekstrak kasar flavonoid rimpang temu putih tidak mengandung senyawaan terpenoid.

Tabel 2 Hasil penapisan fitokimia tanaman segar dan kering serta ekstrak kasar flavonoid

Contoh	Hasil Uji Kualitatif*						
	A	F (g)	F (a)	Sa	T	Te	S
Rimpang temu putih							
Segar	++	+	+	+	-	+	-
Kering	+	+	+	+	-	+	-
Ekstrak kasar flavonoid	+	++	+	+	-	-	-
Daun-batang sambiloto							
Segar	+	+	+	-	+	-	+
Kering	+	+	++	-	+	-	+
Ekstrak kasar flavonoid	-	+++	+++	+	-	-	+

\* Keterangan: A = alkaloid, F(g) = flavonoid glikosida, F(a) = flavonoid aglikon, Sa = saponin, T = tanin, Te = triterpenoid, S = steroid.

(+) = hasil uji positif, jumlah menunjukkan intensitas, (-) = hasil uji negatif.

Hasil uji fitokimia terhadap golongan flavonoid dalam ekstrak kasar flavonoid sambiloto dan temu putih berbeda intensitas warnanya. Pada uji flavonoid golongan aglikon, ekstrak sambiloto menghasilkan warna merah yang cukup pekat pada lapisan amil alkohol, sementara ekstrak temu putih menghasilkan warna jingga. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan jenis flavonoid yang terkandung. Hasil uji fitokimia terhadap senyawa flavonoid glikosida juga memperlihatkan warna merah yang lebih intensif pada ekstrak sambiloto ketika ditambahkan HCl pekat.

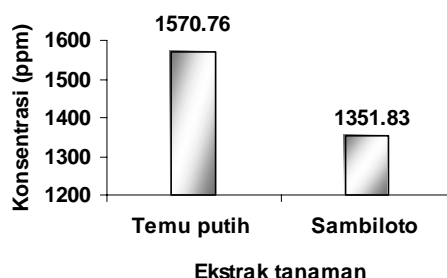
Bagaimanapun, uji fitokimia menunjukkan tingginya kandungan flavonoid pada kedua tanaman. Hal ini didukung oleh nilai absorbans yang cukup besar pada uji total fenol terhadap kedua ekstrak (Tabel 3).

Tabel 3 Hasil uji total fenol pada ekstrak tanaman dengan metode spektrofotometri sinar tampak

Ekstrak kasar tanaman	Absorbans (A)	
	725 nm	760 nm
Blangko	0.0052	0.0081
Sambiloto	1.0362	1.6198
Temu putih	0.9830	1.5528

### Konsentrasi Mematikan 50% (LC<sub>50</sub>)

Penentuan LC<sub>50</sub> pada penelitian ini didasarkan pada konsentrasi ekstrak yang dapat mematikan populasi larva udang sebanyak 50%, biasa dikenal sebagai uji BSLT. Penelitian ini menggunakan dosis standar untuk uji tersebut, yaitu 0, 10, 100, 500, dan 1000 ppm. Nilai LC<sub>50</sub> hasil analisis dengan metode Probit Quant ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Nilai LC<sub>50</sub> ekstrak tanaman terhadap larva *A. salina*.

Nilai LC<sub>50</sub> ekstrak kasar flavonoid tanaman sambiloto dan temu putih berturut-turut ialah 1351.83 dan 1570.76 ppm. Karena kedua ekstrak baru bersifat toksik pada konsentrasi lebih dari 1000 ppm, mereka tidak dapat dikatakan berpotensi bioaktif (Meyer *et al.* 1982). Di sisi lain, kedua ekstrak tanaman tersebut dapat diharapkan tidak akan memberikan efek toksik terhadap tubuh walaupun dikonsumsi secara terus-menerus dalam jangka waktu yang lama.

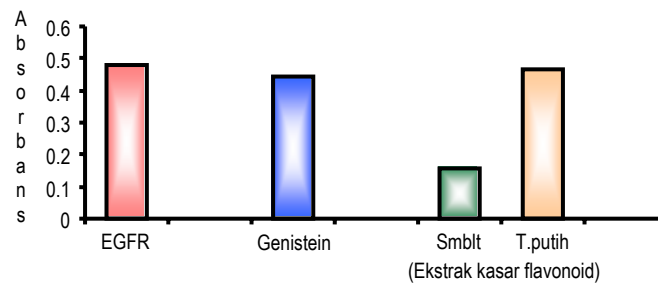
Data total fenol dan nilai LC<sub>50</sub> kedua ekstrak ternyata saling mendukung. Tingginya kandungan total fenol ekstrak sambiloto menyebabkan nilai LC<sub>50</sub>-nya lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak temu putih. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak akan semakin bersifat toksik dengan meningkatnya kadar total fenol.

### Daya Hambat *In Vitro* Ekstrak Kasar Flavonoid terhadap Enzim Tirosin Kinase

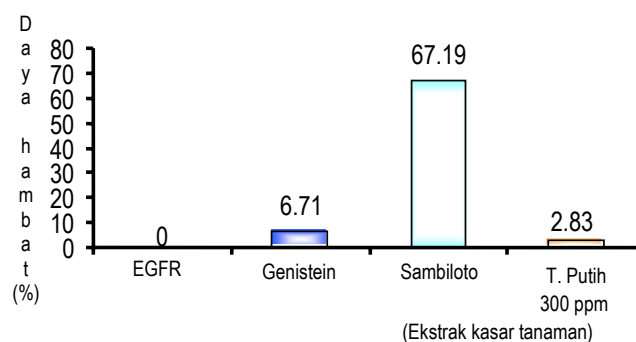
Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini ialah genistein, senyawa isoflavonoid yang lazim digunakan sebagai standar dalam analisis daya hambat terhadap tirosin kinase. Senyawa ini berinteraksi secara kompetitif dengan sisi aktif ATP dan nonkompetitif dengan sisi aktif substrat tirosin kinase (Akiyama *et al.* 1987). Genistein telah digunakan untuk pengobatan kemoterapi sel kanker karena mampu menghambat aktivitas tirosin kinase (Dixon 2005).

Hasil pengukuran disajikan pada Gambar 2. Besarnya nilai absorbans sebanding dengan aktivitas tirosin kinase. Jadi, nilai absorbans yang besar menunjukkan bahwa enzim tersebut tidak atau hanya sedikit diinhibisi aktivitasnya oleh ekstrak kasar flavonoid tanaman. Daya inhibisi ekstrak kasar

sambiloto (67.19%) lebih besar bila dibandingkan dengan kontrol positif (genistein) (6.71%), sedangkan ekstrak kasar temu putih lebih rendah (2.83%) (Gambar 3). Perbedaan daya hambat tersebut diduga karena kandungan senyawa flavonoid yang tidak sama.



Gambar 2 Absorbans hasil uji daya hambat EGFR (kontrol negatif), ekstrak kasar flavonoid, dan genistein (kontrol positif) terhadap enzim tirosin kinase.



Gambar 3 Persen inhibisi EGFR, genistein, serta ekstrak kasar flavonoid sambiloto dan temu putih terhadap enzim tirosin kinase.

## SIMPULAN

Ekstrak kasar flavonoid dari daun-batang tanaman sambiloto dan rimpang temu putih berpotensi menghambat aktivitas enzim tirosin kinase secara *in vitro*. Besar daya inhibisi kedua ekstrak dan genistein berturut-turut ialah 67.19, 2.83, dan 6.71%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama *et al.* 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
- Challem J, Toecus VD, Knittel L. 2002. *The Soy Sensation*. New York: McGraw-Hill.
- Dalimartha S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Dardanella D. 2005. Penapisan beberapa tanaman asli Indonesia yang berpotensi sebagai antikanker secara enzimatis [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Dixon RA, Ferreira D. 2002. Molecules of interest genistein. *Phytochemistry* 60: 205-211.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Kosasih P, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.

- Le Bon AM, Ziegler L, Suschetet M, Fenwick GR. 1993. Comparison of hydroxylated and non-hydroxylated natural flavonoid as *in vitro* modulator of rat hepatic benzo(a)pyrene metabolism. Waldron KW, Johnson IT, editor. Royal Society of Chemistry, Cambridge. Paris: INRA Toxycologic Nutritionelle.
- Mahlmann S. 2000. *Signalling by Tyrosine Kinase on Regular and Disrupted Hemetopiasis*. Swiss: Brusell Institute of Immunology.
- Matter A. 2002. Tyrosine kinase inhibitors in cancer drug discovery. <http://www.cancerprev.org/Journal/Issue/26/101/901/4237>. [21 Jan 2005].
- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Kosasih P, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Techniques of Flavonoid Identification*.
- Meyer BN *et al.* 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45:31-34.
- Nanduri *et al.*, penemu; Dr. Reddy's Research Foundation. 26 Nov 2002. Anticancer compounds: Process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them. US patent 6 486 196.
- O'Dwyer ME, Druker BJ. 2000. *The Role of Tyrosine Kinase Inhibitor ST1571 in The Treatment of Cancer*. Portland: Oregon Health Sciences Univ.
- Rood L. 1998. The possible role of soy in breast cancer prevention and treatment. *Nutr Bytes* 4:1-5.
- Sismindari. 2003. Cytotoxic effects of methanol extract isolated from *Erythrina fusca* Lour leaves on cancer cell-lines. 35(2).
- Sukardiman, Rahman A, Ekasari W. 2001. Efek sitotoksik senyawa andrografolida dari herba sambiloto terhadap kultur sel kanker leukemia [laporan penelitian]. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Voller A, Bidwell D, Bartlett A. 1986. Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infection. Di dalam: Rose NR, Friedman H, editor. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Ed ke-3. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Wei H, Bowen R, Cai Q. 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:124-130.