

POTENSI EKSTRAK ETANOLIK KULIT BUAH JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) SEBAGAI AGEN KHEMOPREVENTIF MELALUI PENEKANAN EKSPRESI c-Myc DAN PENGHAMBATAN PROLIFERASI PADA SEL PAYUDARA TIKUS GALUR SPRAGUE DAWLEY TERINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ[a]ANTRASENA

POTENCY OF CITRUS PEELS (*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) ETHANOLIC EXTRACT AS CHEMOPREVENTIVE AGENT THROUGH DOWNREGULATION OF c-Myc EXPRESSION AND INHIBITION OF 7.12-DIMETHYLBENZ[a]ANTRACHENE INDUCED FEMALE SPRAGUE DAWLEY RATS BREAST CELL PROLIFERATION

Dewi Pratiwi, Novi Hastuti, Niken Nur W, Inna Armandari, Muthi' Ikawati, Adam Hermawan dan Edy Meiyanto*)

Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Penggunaan obat berbasis alam saat ini berkembang pesat di semua kalangan masyarakat. Selain karena harga yang lebih terjangkau, obat berbasis alam relatif lebih aman dibandingkan dengan obat sintetik. Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) merupakan salah satu obat berbasis alam mengandung flavonoid yang berpotensi sebagai antikarsinogenesis. Penelitian ini dirancang untuk mengkaji potensi kulit jeruk nipis (*C. aurantiifolia*) dalam menekan proliferasi sel payudara tikus galur Sprague Dawley yang terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]Antrasena (DMBA). Dalam penelitian ini, tikus dibagi menjadi lima kelompok yakni kelompok perlakuan DMBA, kelompok perlakuan CMC-Na, kelompok perlakuan ekstrak dosis 1500 mg/kgBB, kelompok perlakuan DMBA+ekstrak dosis 750 mg/kgBB dan perlakuan DMBA+ekstrak dosis 1500 mg/kgBB. Pengamatan proliferasi sel payudara dengan metode AgNOR menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit *C. aurantiifolia* dapat menekan proliferasi sel secara signifikan. Secara kuantitatif signifikansi yang dihasilkan dosis 1500 mg/kgBB lebih tinggi daripada dosis 750 mg/kgBB. Hasil pengamatan imunohistokimia pada ekspresi c-Myc mendukung data sebelumnya. Pada kelompok dosis 750 terlihat warna coklat pada sitosol yang lebih intens dibanding kelompok dosis 1500. Ekstrak etanolik kulit jeruk nipis dapat menekan proliferasi sel payudara terinduksi DMBA, penekanan proliferasi tersebut meningkat seiring peningkatan dosis sehingga jeruk nipis dapat digunakan sebagai agen khemopreventif.

Kata kunci: proliferasi, Citrus aurantiifolia, AgNOR, Imunohistokimia, c-Myc

ABSTRACT

The using of natural-based medicine is growing rapidly in societies. Besides being cheap and affordable, natural-based medicine is relatively safer than the synthetic drugs. Peel of *Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) is one of the chemopreventive agent which contain flavonoids have potency as anticarcinogenic agent. This study is designed to study the potency of *Citrus aurantiifolia* peel ethanolic extract in proliferation inhibition of *Rattus norvegicus* mammary cell of Sprague Dawley strain which is induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). Rats were divided into five groups consist of DMBA treatment, CMC-Na treatment, extract 1500 mg/kgBW treatment, treatment of DMBA+ extract 750 mg/kgBW and DMBA+ extract 1500 mg/kgBW. At the beginning of the tenth week of the study, breasts was isolated and stored in 10% formalin buffer. Observation of cell proliferation was done by AgNOR method. C-Myc expression observed using immunohistochemistry (IHC). Observation of mammary cell with AgNOR method indicated that the treatment of *Citrus aurantiifolia* peel ethanolic extract can inhibit cell proliferation significantly. Dosage 1500 mg/kgBW gave higher inhibition effect than dosage 750 mg/kgBW. IHC result showed that treatment of *Citrus aurantiifolia* peel ethanolic extract decrease the expression of c-Myc. Dosage 750 mg/kgBW gave lower decreasing effect than dosage 1500 mg/kgBW. *Citrus aurantiifolia* peel ethanolic extract inhibited the proliferation of mammary cell induced DMBA through the inhibition of c-Myc expression in dose dependent phenomena so that it is a potential chemopreventive agent.

Key words : *proliferasi, Citrus aurantiifolia, AgNOR, Immunohistochemistry, c-myc*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di seluruh dunia (Basu *et al.*, 2004). Pengobatan dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi belum dapat diandalkan karena memiliki selektivitas rendah, efek samping tinggi dan harganya mahal. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai antikanker berbasis alam yang lebih selektif dan aman.

Jeruk nipis (*C. aurantiifolia*) mengandung flavonoid yang dikenal mempunyai efek anti-inflamasi, antioksidan, hepatoprotektif dan antikarsinogenik (Hertog, 1995). Flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk nipis antara lain naringin, hesperidin, naringenin, rutin, hesperitin, nobiletin, dan tangeretin (Choi *et al.*, 2007). Hesperidin, naringin dan naringenin mempunyai efek sebagai agen kemopreventif karsinogenesis, penghambatan proliferasi sel kanker, dan menghambat tumorigenesis (De Leo and Del Bosco, 2005 *cit* Tanaka, 1997; So *et al.*, 1996). Hesperidin dapat menghambat melanogenesis sel melanoma tikus dengan IC50 16,08 mM (Zhang *et al.*, 2007). Penelitian terhadap sel epitel trakea terinduksi agen karsinogenik benzo(a)piren membuktikan rutin mempunyai potensi sebagai agen kemopreventif (Steele *et al.* 1990). Rutin dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara sebagai inhibitor kompetitif estrogen pada estrogen reseptor dengan konsentrasi 10 nM dan 10 mM (Scambia *et al.*, 1990). Tangeretin mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MDA-MB-435 dan MCF7 secara *in vitro* (Morley *et al.*, 2007). Dengan demikian ekstrak etanolik *C. aurantiifolia* yang mengandung flavonoid-flavonoid tersebut mempunyai potensi untuk menghambat terjadinya karsinogenesis pada kanker payudara.

Berdasarkan data-data di atas dapat diketahui bahwa hesperidin dan naringin yang terkandung dalam *C. aurantiifolia* berpotensi sebagai antikanker melalui penekanan proliferasi

sebagai antikanker, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif antikanker oleh masyarakat luas.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari s/d Mei 2008 di Laboratorium Penelitian *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas Farmasi UGM, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Farmasi UGM.

Bahan Utama

Ekstrak yang digunakan berasal dari kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) yang sehat, berwarna hijau, diambil dari daerah Banyuwangi, Jawa Timur. Kulit jeruk nipis dimaserasi menggunakan etanol 70 % dan diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapat ekstrak kental. Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur *Sprague Dawley* yang berumur 40 hari dengan berat badan 70-92 gram diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan.

Jalannya Penelitian

Perlakuan pada hewan uji

Tikus betina *Sprague Dawley* umur 40 hari, beratnya sekitar 70-92 g sebanyak 6 ekor tiap kelompok ditempatkan dalam kandang dengan suhu 28-32°C, kelembapan nisbi 98%, dan diberi makanan pelet serta diberi minum air ledeng. Terdapat lima kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri 6 ekor yaitu kelompok I merupakan kontrol CMC-Na 0,5 % yang diberikan setiap hari selama dua minggu, kelompok II merupakan kontrol ekstrak. Ekstrak etanolik jeruk nipis 1500 mg/kg BB diberikan setiap hari selama 2 minggu, kelompok III merupakan kelompok kontrol DMBA, yaitu dibuat model kanker dengan pemberian DMBA dalam *corn oil* dengan dosis 20 mg/kg BB secara per oral sebanyak 10 kali, yaitu seminggu kali selama 5 minggu kelompok IV-V, yaitu kelompok perlakuan diberi ekstrak etanolik kulit jeruk nipis dengan peringkat dosis 750 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB setiap hari selama 10 hari setelah inisiasi (pemberian DMBA). Terjadinya kanker pada hewan uji setelah induksi DMBA memerlukan waktu selama ±3,5 minggu.

Ekstrak dipejankan secara per oral (p.o) dalam bentuk sediaan suspensi dalam CMC-Na 0,5%. Sebagai kontrol pelarut, CMC-Na dan *corn oil* diberikan dengan volume maksimal 1 mL secara p.o. Hewan uji dikorbkan pada minggu ke-10, kemudian organ payudara hewan uji dipreparasi.

*Korespondensi : Edy Meiyanto
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta
Email : meiyana_e@ugm.ac.id

sel. Untuk mendukung data-data ilmiah tersebut, diperlukan sebuah penelitian secara *in vivo* terhadap tikus terinduksi kanker. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai potensi jeruk nipis (*C. aurantiifolia*)

Metode Immunohistokimia (IHC)

Pengamatan ekspresi c-Myc pada sel payudara dilakukan dengan metode Immunohistokimia dengan anti-c-Myc. Preparat jaringan yang akan diamati terlebih dahulu dideparafinisasi dengan xylol selama 5 menit. Jaringan kemudian dihidrasi dengan etanol 96%, etanol 80%, dan etanol 70% masing-masing selama 5 menit. Jaringan kemudian dicuci menggunakan aquades.

Jaringan dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*), difiksasi dengan paraformaldehid 1% dalam PBS dan dicuci. Diinkubasi selama 1 jam dengan BSA 8% dalam PBS dan dicuci dua kali menggunakan PBS masing-masing 5 menit.

Selanjutnya antibodi didilusikan dalam BSA 1% dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar, dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Langkah tersebut diulang, kemudian diinkubasi selama 1-2 jam pada suhu kamar dalam keadaan gelap agar sel tidak kering. Sel dicuci dalam keadaan gelap menggunakan PBS tiga kali selama 5 menit. Sel kemudian diamati ekspresinya dengan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan p53 akan memberikan warna coklat atau gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan memberikan warna ungu.

Metode Argyrophillic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR)

Preparat dideparafinasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit, kemudian dilanjutkan rehidrasi dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95% dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Preparat histologi jaringan diimmersikan dalam bufer natrium sitrat (pH 6,0) kemudian diinkubasi di dalam autoklaf pada suhu 120 °C (tekanan 1,1-1,2 bar) selama 20 menit. Preparat didinginkan sampai suhu 37 °C, kemudian diimmersikan ke dalam larutan pengecatan perak yang terdiri dari 1 bagian volume gelatin 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 25% dalam suhu 37°C, selama 11 menit. Reaksi dihentikan

dengan mencuci slide menggunakan aqua bidestilata untuk menghilangkan presipitat perak non-spesifik. Selanjutnya, semua jaringan didehidrasi menggunakan etanol dengan konsentrasi yang dinaikkan secara bertingkat (50%, 70%, 95%), dibersihkan dengan *xylene* dan ditutup dengan *coverslip* (Derenzini *et al.*, 2003). Seluruh prosedur pengecatan dilakukan sesuai standar prosedur pengecatan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah

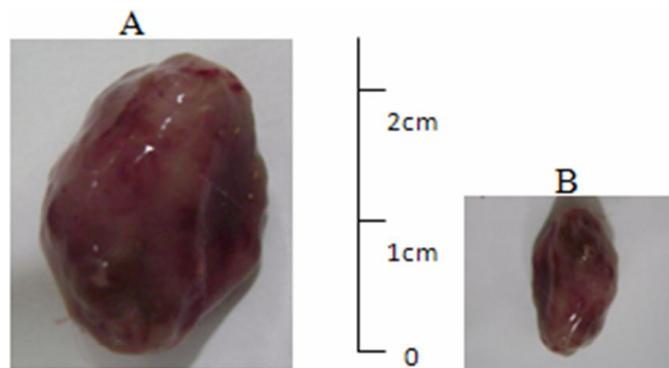
Mada. Pengamatan tingkat proliferasi sel dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Analisa Data

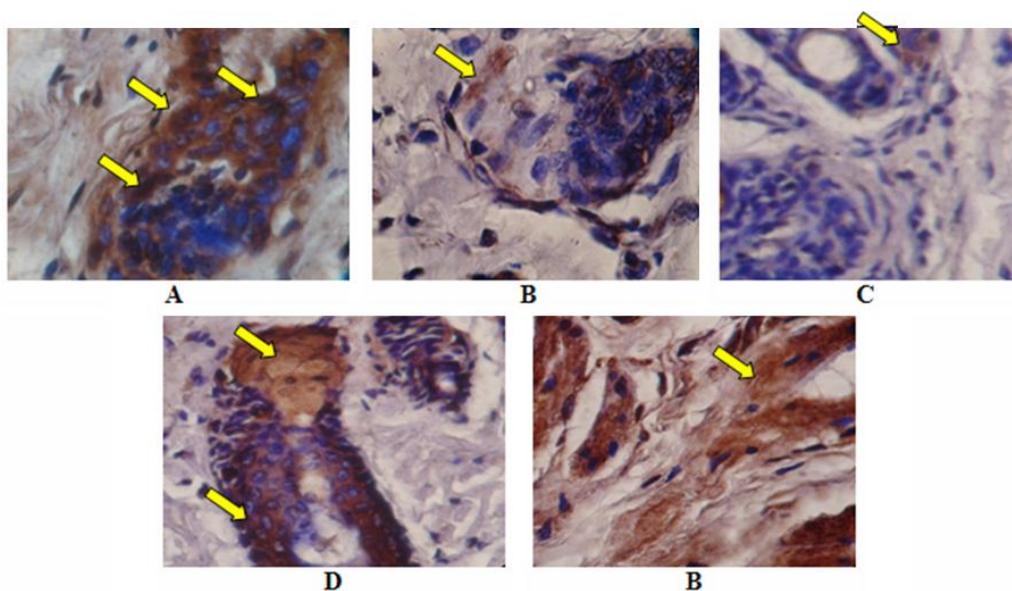
Analisis makroskopis kualitatif dilakukan dengan mengamati ada tidaknya nodul tumor pada organ payudara. Analisis mikroskopis dilakukan dengan mengamati tingkat proliferasi dengan metode imunohistokimia. Analisis kuantitatif tingkat proliferasi sel dilakukan dengan parameter mAgNOR, yaitu dengan menghitung purata *blackdots* pada minimal 100 sel yang diamati (Derenzini *et al.*, 2003) dan dilanjutkan analisis statistik metode *one way ANOVA* dengan tes *Tukey* taraf kepercayaan 95%. Analisis kualitatif c-Myc dilakukan dengan mengamati sel yang menunjukkan warna coklat pada sitosol. Pengamatan preparat dilakukan sebanyak sepuluh lapang pandang yang berbeda untuk tiap preparat.

HASIL DAN PEMBAHASAN**Gambaran Makroskopis Hewan Uji**

Secara makroskopis di sekitar payudara ditemukan adanya nodul pada terdapat pada pangkal paha kanan tikus kelompok perlakuan kontrol DMBA 20 mg/kgBB yaitu tikus nomor 2 Gambar 1). Panjang nodul berkisar antara $\pm 2,3$ cm. Adanya perubahan makroskopis pada sekitar payudara juga terjadi pada pangkal paha kiri tikus nomor 6 kelompok yang sama dengan panjang nodul $\pm 1,0$ cm. Terlihat bahwa induksi kanker oleh DMBA menunjukkan hasil yang positif.



Gambar 1. Gambaran makroskopis nodul hewan uji. Hasil nekropsi menunjukkan munculnya nodul tumor pada kelompok perlakuan DMBA tikus nomor 2 (A), tikus nomor 6 (B).



Gambar 2. Ekstrak etanolik kulit *C. aurantifolia* menekan ekspresi c-Myc pada sel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA.

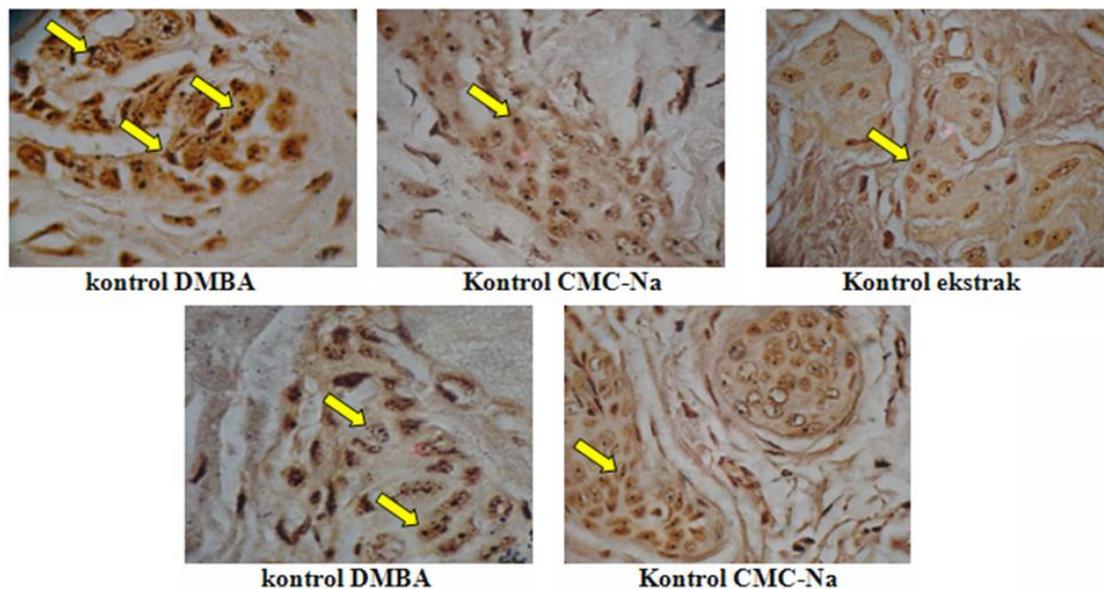
Pengecatan dilakukan dengan imunohistokimia *indirect method* yang menunjukkan sel yang mengekspresikan protein c-Myc. Sel yang mengekspresikan c-Myc ditunjukkan dengan sitosol yang berwarna coklat. Profil di atas menunjukkan sel payudara tikus kelompok: kontrol DMBA (A) kontrol CMC-Na (B), kontrol Ekstrak (C), DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB (D), DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB (E), diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Preparat diligasi dengan antibodi monoklonal c-Myc, antibodi sekunder terlabel peroksidase, kemudian dikarakterisasi dengan *double staining* menggunakan DAB dan hematoxylin eosin

Pada kelompok perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB maupun kelompok perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB tidak ditemukan adanya nodul. Dari hasil ini ditegaskan bahwa ekstrak etanolik jeruk nipis mempunyai aktivitas sebagai agen kemopreventif yang dapat mengurangi insidensi kanker pada hewan uji. Sedangkan pada kelompok perlakuan CMC-Na dan kelompok perlakuan ekstrak 1500 mg/kgBB tanpa

perlakuan DMBA tidak menunjukkan perubahan secara makroskopis. Ini memberikan arti bahwa ekstrak etanolik jeruk nipis dan pelarut CMC-Na tidak menyebabkan karsinogenesis pada hewan uji.

Untuk menegaskan diagnosis bahwa memang terjadi perubahan pada payudara hewan uji perlu dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis. Analisis mikroskopis

dilakukan dengan pengamatan ekspresi c-Myc secara kualitatif dan metode AgNOR secara kuantitatif.



Gambar 3. Ekstrak etanolik kulit *C. aurantiifolia* menghambat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA.

Pengamatan tingkat proliferasi sel dilakukan dengan pewarnaan AgNOR. Aktivitas proliferasi ditunjukkan oleh jumlah *blackdots* yang terdapat di setiap sel. Profil di atas menunjukkan sel epitel kelenjar payudara tikus kelompok: kontrol DMBA (A), kontrol CMC-Na (B), kontrol ekstrak (C), perlakuan DMBA+ ekstrak 750 mg/kgBB (D), perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB (E) pada mikroskop dengan perbesaran 1000x. Preparasi dalam buffer natrium sitrat pH 6,0, kemudian diinkubasi dalam autoklaf pada suhu 120 °C tekanan 1,1-1,2.

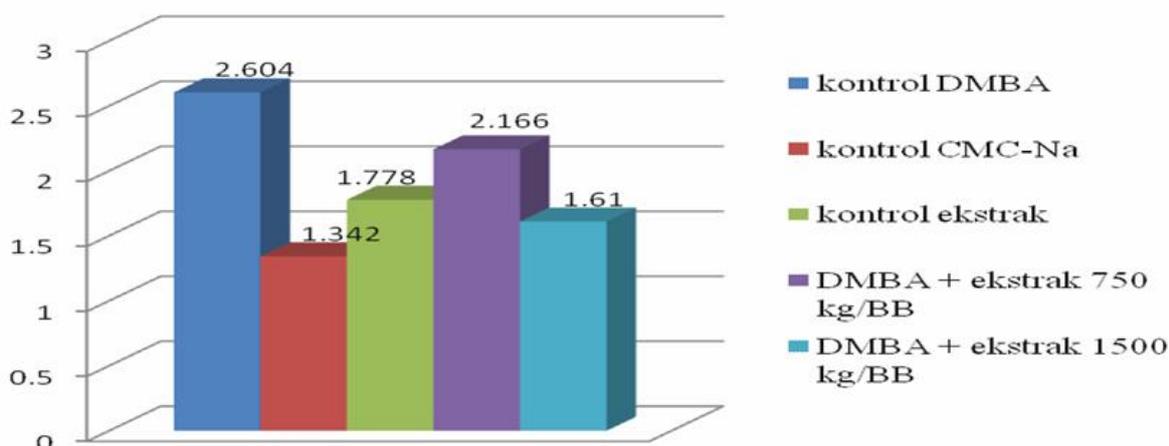
Penentuan Ekspresi Protein c-Myc Menggunakan Metode Pengecatan Immunohistokimia (IHC)

Imunohistokimia merupakan metode yang biasa digunakan untuk menentukan adanya antigen dalam suatu jaringan yang telah dilabel dengan antibodi, interaksi antigen-antibodi dapat diamati melalui fluoresensi, enzim dan elemen radioaktif (Coons *et al.* 1941, 1955; Coons and Kaplan 1950). Interaksi antigen-antibodi yang dihasilkan dari metode Imunohistokimia adalah spesifik sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi ekspresi protein. Dalam identifikasi ekspresi protein cMyc, digunakan antibodi monoklonal yang secara spesifik dapat mengenali c-Myc.

c-Myc merupakan proto onkogen yang akan diekspresi menjadi protein c-Myc. c-Myc merupakan salah satu faktor transkripsi yang berperan penting dalam proses pembelahan sel yang diantaranya adalah pertumbuhan sel, proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. (Nesbit, 1999). Ekspresi c-Myc berperan penting dalam pertumbuhan dan progresi dari sel kanker payudara. Amplifikasi *c-Myc* pada umumnya

terjadi sebelum proses invasi, dan merupakan faktor penting untuk menginduksi terjadinya invasi tumor (Shiu,1993).

Hasil pengamatan mikroskop menunjukkan kontrol DMBA (gambar 2A) terjadi aktivitas hiperproliferasi karena ekspresi c-Myc yang tinggi (warna coklat yang intens pada sitosol). Pada kontrol CMC-Na dan kontrol ekstrak (gambar 2B dan 2C) warna coklat pada sitosol kurang intens berarti ekspresi c-Myc dalam jumlah relatif normal untuk proliferasi sel. Perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB (gambar 2D) terlihat warna sitosol yang relatif kurang intens dibandingkan dengan kontrol DMBA sehingga dapat diartikan bahwa ekstrak mampu menekan ekspresi c-Myc akibat induksi dari DMBA. Warna coklat yang ditunjukkan oleh perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB (gambar 2E) terlihat relative lebih terang (kurang intens) dibandingkan dengan perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB, dengan demikian aktivitas penekanan ekspresi c-Myc oleh ekstrak mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya dosis yang diberikan.



Gambar 4. Ekstrak etanolik kulit *C. aurantiifolia* menurunkan nilai mAgNOR pada sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA.

Data diperoleh dengan menghitung jumlah *blackdots* (titik hitam) pada minimal 100 sel kemudian dirata-rata dengan cara membagi jumlah *blackdots* dengan jumlah sel yang diamati. Replikasi tiap kelompok 10 lapang pandang. Analisis data menggunakan uji one way ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%. Grafik menunjukkan purata *blackdots* tiap kelompok..

Penentuan Aktivitas Proliferasi dengan Metode *Argyrophillic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR)*

Salah satu metode yang dapat memberikan informasi aktivitas proliferasi sel tumor secara kuantitatif adalah pengecatan AgNOR. Metode ini memperkirakan pembelahan sel dengan mengkuantifikasi protein AgNOR yang mengindikasikan aktivitas proliferasi kultur sel atau sebuah tumor (Lorenzato et al, 1999). Hal ini dapat menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ataupun penurunan aktivitas proliferasi sel pada semua kelompok hewan uji.

Kelompok perlakuan DMBA memiliki nilai mAgNOR paling tinggi (gambar 3A), artinya aktivitas proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA paling tinggi dibandingkan yang lain. Nilai mAgNOR dari kontrol CMC-Na dan kontrol ekstrak menunjukkan mAgNOR yang lebih rendah. Sel epitel kelenjar payudara tikus kedua kelompok tersebut berproliferasi secara normal. Perlakuan DMBA+ekstrak 750 Kg/BB menunjukkan nilai mAgNOR yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol DMBA, sehingga memberi gambaran bahwa ekstrak *C. aurantiifolia* yang diberikan dapat menghambat aktivitas proliferasi yang berlebihan. mAgNOR pada perlakuan DMBA+ekstrak 1500 Kg/BB lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan DMBA+ekstrak 750 Kg/BB. Hal ini menunjukkan

bahwa semakin meningkat dosis ekstrak, aktivitas penghambatan proliferasi turut meningkat.

Secara statistik menggunakan uji *Komolgorov-Smirnov*, hasil kuantifikasi mAgNOR masing-masing kelompok perlakuan dalam penelitian ini memberikan respon yang terdistribusi normal dan homogen. Hasil analisis statistik *one way ANOVA* dan uji *Tukey* menunjukkan nilai mAgNOR antara kelompok DMBA berbeda signifikan dengan kelompok tanpa perlakuan, DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB, dan DMBA+ekstrak 1500 mg/kg BB (tabel II). Tingkat proliferasi paling tinggi yang terdapat di kelompok DMBA menunjukkan pembelahan sel yang tidak terkontrol. Perlakuan DMBA dosis 20 mg/kgBB sebanyak 10 kali dalam 4 minggu dapat menginisiasi proliferasi sel yang abnormal. Nilai mAgNOR kelompok DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB berbeda signifikan dengan nilai mAgNOR kelompok DMBA, artinya perlakuan ekstrak etanolik kulit *C. aurantiifolia* efektif menurunkan tingkat proliferasi sel epitel kelenjar payudara tikus terinduksi DMBA. Perbedaan signifikan antara kelompok DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB menunjukkan peningkatan dosis ekstrak etanolik kulit *C. aurantiifolia* menghasilkan efek antiproliferatif yang lebih besar pula.

Flavonoid memiliki struktur dasar dua benzen (A dan B) yang dihubungkan oleh piron atau piron heterosiklik (C6-C3-C6), dan menunjukkan aktivitas biologi yang cukup tinggi sebagai *cancer prevention*. Flavonoid memberikan efek signifikan sebagai *cancer chemoprevention* dan pada *chemotherapy* yang ditunjukkan dari studi laboratorium, investigasi epidemiologi, dan uji klinik pada manusia (Ren *et al.*, 2003). Choi *et al.*, (2007) melaporkan kandungan dalam kulit jeruk nipis adalah senyawa berkerangka flavanon yaitu naringin, hesperidin, naringenin, hesperitin, rutin, nobiletin, dan tangeretin. Beberapa penelitian membuktikan bahwa flavonoid yang terkandung dalam *C. aurantiifolia*. Efek penghambatan karsinogenesis, penghambatan tumorigenesis dan inhibisi terhadap karsinogenesis ditunjukkan oleh hesperidin, naringin dan naringenin (De Leo and Del Bosco, 2005 cit Tanaka, 1997; So *et al.*, 1996). Flavonoid rutin dilaporkan dapat menghambat proliferasi pada sel kanker payudara (Scambia *et al.*, 1990). Oleh karena itu, ekstrak etanolik kulit jeruk nipis diprediksikan mempunyai potensi sebagai agen khemopreventif.

Model kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah induksi DMBA pada tikus galur Sprague Dawley. Tikus galur ini telah dibuktikan paling sensitif terhadap karsinogenesis (Singletary, 1997). Induksi DMBA pada tikus akan menginduksi terjadinya *DNA adduct* dan pada akhirnya akan menginduksi terjadinya kanker.

DNA adduct akibat dari induksi DMBA dapat mengakibatkan over ekspresi c-Myc yang menyebabkan terjadinya aktivitas hiperproliferasi sel. Dari penelitian ini diperoleh bukti bahwa ekstrak etanolik kulit *C. aurantifolia* menunjukkan penghambatan terhadap ekspresi c-Myc. Hal ini didukung adanya penelitian Vanamala *et al.* (2005) yang melaporkan bahwa flavonoid hesperidin yang terkandung dalam *C. aurantiifolia* dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada *colonocytes*, dan menekan AOM yang menginduksi karsinogenesis di kolon. Pada kelompok perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/kgBB teramati warna coklat yang lebih intensif pada sitosol daripada kelompok DMBA+ekstrak 750 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak yang lebih tinggi meningkatkan aktivitas penghambatan proliferasi sel.

Mekanisme penghambatan proliferasi oleh ekstrak etanolik *C. aurantiifolia* adalah melalui penekanan ekspresi c-Myc. c-Myc merupakan salah satu proto oncogen yang diregulasi oleh MAPK *pathway*. c-Myc pada sel normal diekspresi saat sel berproliferasi (Pearson, 2001). c-Myc

merupakan salah satu faktor transkripsi yang meregulasi protein-protein yang terlibat dalam *cell cycle*. Over ekspresi c-Myc akan memacu proliferasi sel yang berlebihan. Penekanan ekspresi c-Myc pada sel kanker akan menghambat Wnt *pathway* yang merupakan *downstream* dari c-Myc. Wnt *pathway* ini pada akhirnya akan mengaktifkan protein Cyclin D1 yang terlibat dalam siklus sel. Dengan demikian penghambatan ekspresi c-Myc akan mencegah aktivasi Cyclin D dan akibatnya hiperproliferasi sel terhambat.

Efek antiproliferasi dari ekstrak etanolik kulit jeruk nipis juga didukung dengan hasil pengamatan menggunakan metode AgNOR. Uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan DMBA+ekstrak 750 mg/KgBB dan perlakuan DMBA+ekstrak 1500 mg/KgBB berbeda signifikan dengan kontrol DMBA. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanolik kulit *C. aurantiifolia* dapat menurunkan aktivitas hiperproliferasi secara bermakna.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanolik jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terbukti dapat menekan karsinogenesis melalui penekanan ekspresi c-Myc dan penghambatan proliferasi pada sel epitel payudara tikus terinduksi DMBA, sehingga kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dapat digunakan sebagai agen khemopreventif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian melalui PKM 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Basu, G. D., Pathangey, L.B., Tinder, T.L., Gendler, S.J., and Mukherjee, P. (2004). 'Mechanisms Underlying the Growth Inhibitory Effects of the Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor Celecoxib in Human Breast Cancer Cells', *J. from Breast Cancer Research*, 2(11), 632-642.
- Choi, Soo-Youn., Ko, Hee-Chul., Ko, Soo-Youn., Hwang, Joon-Ho., Park, Ji-Gweon., Kang, Shin-Hae., Han, Sang-Hun., Yun, Su-Hyun., and Kim, Se-Jae. (2007). 'Correlation between Flavonoid Content and the NO Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various Citrus Fruits', *Biol. Pharm. Bull.* 30(4) 772-778.
- De Leo, F. and Del Bosco, F.S. (2005). Citrus Flavonoids as Bioactive Compounds: Role, Bioavailability, Socio-Economic Impact and Biotechnological Approach For Their Modification, 9th ICABR International

- Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later, *Ravello*, Italy.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens E, Hollman PCH and Katan MB (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155:381–386.
- Morley, Karen, Ferguson, Peter., and Korotpatnick, J., 2007, Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells, *Cancer Letters*, 251(1), 168-178.
- Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, Piantelli M, Rumi C, Battaglia F, Larocca LM, Capelli A and Mancuso S (1990b) Type-II estrogen binding sites in a lymphoblastoid cell line and growth-inhibitory effect of estrogen, anti-estrogen and bioflavonoids. *Int J Cancer* 46:1112–1116.
- Shiu, Robert P., Watson, Peter H., and Dubik, Don, 1993, c-myc Oncogene Expression in Estrogen-Dependent and -Independent BreastCancer, *Clin. Chem.* 39/2, 353-355.
- Singletary, K, MacDonald, C., and Wallig, M., 1997, The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) inhibits 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)-induced rat mammary DNA adduct formation and tumorigenesis, *Carcinogenesis*, 18(8),1669–1673
- Vanamala, J., Leonardi , Tety., Patil, Bhimanagouda S., Tadde, Stella S, Murphy, Mary E., Pike, Leonard M., Chapkin, Robert S., Lupton, Joanne R., and Turner, and Nancy D. (2005). 'Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit', *Carcinogenesis Advance Access. Oxford University press*, England.
- Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Su, X., and Wei, D. (2007). 'Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts', *J. Enzyme Inhib Med Chem.* 22(1):91-8.