

**PENGUNAAN EKSTRAK ETANOLIK KULIT BUAH JERUK MANDARIN (*Citrus reticulata*)
UNTUK MENINGKATKAN SENSITIVITAS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7
TERHADAP AGEN KEMOTERAPI DOXORUBICIN**

**ETHANOLIC EXTRACT OF MANDARIN ORANGE (*Citrus reticulata*) PEELS TO INCREASE
THE SENSITIVITY OF MCF-7 BREAST CANCER CELL TO DOXORUBICIN**

**Sandro Rossano Yunas*, Nurul Latifah*, M. Rifqi Rokhman*,
Aditya Fitriasari* dan Edy Meiyanto****

**Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta*

*** Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Farmasi UGM*

ABSTRAK

Hingga kini masih belum ditemukan langkah terbaik untuk menyembuhkan kanker payudara yang telah mencapai tahap metastasis. Pengobatan dengan agen kemoterapi bersifat tidak selektif karena selain membunuh sel kanker, obat ini juga dapat merusak sel normal pada berbagai jaringan tubuh. Untuk itu, perlu dipikirkan alternatif lain seperti mengkombinasikan agen kemoterapi dengan senyawa yang berasal dari bahan alam untuk menurunkan efek toksik terhadap jaringan normal dan meningkatkan efikasi agen kemoterapi terhadap sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penggunaan kombinasi ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin (EJM) atau *Citrus reticulata* yang diduga bersifat kemopreventif, dengan agen kemoterapi Doxorubicin (Dox) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Efek penghambatan perlakuan EJM-Dox dilakukan dengan metode MTT. Ternyata, didapatkan hasil penelitian yang berkebalikan dengan hipotesis awal. Perlakuan EJM (50-400 ug/ml) selama 48 jam justru menghasilkan proliferasi sel antara 53-123% sedangkan perlakuan dengan Dox (100-1000 nM) menghasilkan penghambatan sel 49-141%. Fakta yang menarik adalah bahwa ketika EJM dikombinasikan dengan Dox dosis 500 dan 700 nM, tidak menunjukkan efek proliferasi seperti perlakuan tunggal EJM. Data pendukung perlakuan EJM terhadap sel lain (T47D) menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi EJM tidak menyebabkan peningkatan penghambatan sel. Maka, penelitian ini membuka tabir kemungkinan pemanfaatan lain EJM sebagai agen untuk memperindah payudara dan kulit.

Kata kunci: doxorubicin, ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin, kanker payudara

ABSTRACT

Metastatic breast cancer is still very challenging to be cured. Chemotherapeutic agents are usually nonselective because these agents also damage normal cells in normal human tissues. Therefore, the search for an alternative therapy such as combination of chemotherapeutic agents with natural compound to reduce toxicity and improving efficacy is still interesting to be done. The aim of this research was to evaluate the effect of mandarin orange peels ethanolic extract (MOPEE) and doxorubicin (Dox) combination to MCF-7 breast cancer cells. The inhibitory effect of MOPEE-Dox combination was evaluated with MTT method. The observation showed that incubation with EJM (50-400 ug/ml) make the MCF-7 breast cancer cells result in 53-123% proliferation, while Dox (100-1000 nM) incubation result in 49-141% cells inhibition. However, incubation of the cells with MOPEE-Dox (500 and 700 nM) did not show any proliferating effects. The incubation of T47D cell lines in MOPEE showed that increasing MOPEE concentration did not increase its inhibitory effect; therefore MOPEE has an alternative potency as a cosmeceuticals for breast and skin.

Key words: doxorubicin, mandarin orange peels ethanolic extract, breast cancer

PENDAHULUAN

Dewasa ini, penelitian mengenai kombinasi agen kemoterapi dengan senyawa yang berasal dari bahan alam dilakukan sebagai alternatif pengobatan penyakit kanker. Hal ini dikarenakan adanya efek sinergis antara masing-masing komponen yang menaikkan

efikasi, sekaligus menurunkan efek samping yang tergantung dosis (Adams, *et al.*, 2006). Salah satu senyawa alam yang telah diteliti memiliki efek antikanker adalah flavonoid (Middleton and Kandaswami, 1993 dan Pan, *et al.*, 2003). Tangeretin, salah satu flavonoid utama yang terkonsentrasi dalam kulit buah

jeruk (Nelson, 1934), telah diteliti kegunaannya sebagai agen antitumor. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa tangeretin menginduksi peristiwa *cell-cycle G₁ arrest* (Pan, *et al.*, 2003) serta memiliki nilai IC₅₀ yang paling kecil dibandingkan beberapa flavonoid lain pada sel kanker kolon COLO 205. Penelitian lain (Slambrouck, *et al.*, 2005) menyebutkan bahwa tangeretin menghambat proses fosforilasi *extra-cellular-signal-regulated-kinase* (ERK) sehingga menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Tangeretin pun telah dikombinasikan secara *in vitro* dengan tamoxifen dalam terapi kanker payudara dan menunjukkan efek sinergis (Brache, *et al.*, 1994). Namun, belum ada penelitian yang melaporkan efek penggunaan kombinasi tangeretin yang terdapat dalam ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin dengan doxorubicin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek dari ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) sebagai kombinasi doxorubicin secara *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi publikasi ilmiah sebagai langkah awal dalam mengembangkan obat kanker berbasis bahan alam secara *in vitro* sehingga dapat dijadikan pijakan dan arah untuk melakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* di masa mendatang.

METODE PENELITIAN

Preparasi Bahan Uji

Kultur sel yang digunakan adalah MCF-7 *cell line* (ATCC) dan T47D yang merupakan *cell line* yang diturunkan dari kanker payudara yang mengekspresikan Reseptor Estrogen. Kultur sel merupakan koleksi dari *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas Farmasi UGM. Ditumbuhkan pada media penumbuh DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% $\frac{v}{v}$ (Gibco), penisillin-streptomisin 1% $\frac{v}{v}$ (Gibco), kemudian disimpan dalam inkubator CO₂ *thermostat* (Heraceus). Sedangkan untuk agen kemoterapi doxorubicin diperoleh dengan membeli di Rumah Sakit dr. Sardjito, Yogyakarta.

Buah jeruk Mandarin lokal berwarna hijau kekuningan dipetik dalam keadaan setengah matang pada bulan Maret dari daerah Kali Soro, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Buah dipisahkan dari daun dan batangnya, dibersihkan, kemudian dikupas. Kulit jeruk dirajang dan dikeringkan pada ruangan ber-AC suhu 17°C selama 4 hari. Berat total kulit jeruk kering ditimbang, kemudian diblender hingga didapat serbuk kasar.

Pembuatan Ekstrak Kental

Serbuk kasar disari dengan etanol 96% menggunakan metode maserasi. Tiap 10 l penyari digunakan dalam 3 tahap untuk 1 kg serbuk, masing-masing tahap dilakukan selama 3 hari dengan penggojogan rutin. Maserat disaring menggunakan kain kasa kemudian dilanjutkan dengan kertas saring berlapis. Filtrat (keruh) hasil penyaringan 3 tahap maserasi dikumpulkan, kemudian didiamkan lagi selama 2 hari hingga mengendap dan disaring dengan cara penyaringan maserat di atas. Filtrat (jernih) diuapkan dengan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* (Heidolph WB 2000) hingga didapat ekstrak kental. Hasil ekstrak kental ditimbang dalam flakon dengan timbangan elektrik (Shimazu, type LS-6DT).

Uji Kualitatif Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT menggunakan sistem kromatografi fase normal, dengan fase diam silika gel GF 254 (Merck) dan fase gerak etil asetat-metanol-air (100:13,5:10) (8). Ekstrak kental dan pembanding (flavonoid rutin) dilarutkan dalam etanol, ditotolkan pada permukaan plat sampai dapat menimbulkan bercak pemadaman di bawah sinar UV 254, kemudian dielus. Identifikasi bercak dilakukan di bawah sinar UV 254 nm dan UV 365 nm.

Pembuatan Larutan Uji

Stok dibuat dengan melarutkan 60 mg ekstrak kental ke dalam 150 μ L DMSO 100% (Sigma). Ekstrak kulit jeruk kemudian dibuat dalam seri konsentrasi 50-400 μ g/mL menggunakan stok yang diencerkan dengan media kultur. Doxorubicin dibuat dalam seri konsentrasi 100-1000 nM menggunakan pengenceran dengan media kultur.

Uji Sitotoksik

Sel dengan konsentrasi 3×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam 96 *well plate* (Nunclon) dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Setelah itu media dibuang, lalu ditambahkan 100 μ L media kultur yang telah mengandung DMSO (kontrol) atau sampel (baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi) ke dalam sumuran, inkubasi lagi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma) konsentrasi 5 mg/mL, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media

yang mengandung MTT dibuang, dicuci dengan 100 μL PBS tanpa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (ditambahkan 100 μL PBS, lalu diambil kembali secara hati-hati sebanyak 90 μL menggunakan mikropipet) kemudian ditambahkan 200 μL larutan *stopper* isopropanol-HCl untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca absorbansinya dengan *Microplate reader* (Anthos, 2001, COM1) pada panjang gelombang 550 nm.

Analisis Hasil

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup menggunakan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Jumlah Sel Hidup Pada Sampel}}{\text{Jumlah Sel Hidup Pada Kontrol}} \times 100\%$$

$$\frac{\text{Absorbansi Sel Perlakuan} - \text{Absorbansi Media}}{\text{Absorbansi Sel Kontrol} - \text{Absorbansi Media}} \times 100\%$$

Kemudian dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan metode regresi linear untuk mendapatkan linearitas antara log konsentrasi dengan persen sel hidup. IC_{50} adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya.

Untuk analisis terhadap uji secara ko-kemoterapi (kombinasi), sitotoksitas sinergistik ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara agen kemoterapi dengan ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*), menggunakan persamaan:

$$I = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

di mana Dx adalah konsentrasi dari satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek (dalam hal ini adalah IC_{50} terhadap pertumbuhan sel kanker payudara) dan $(D)_1$, $(D)_2$ adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama (9).

HASIL PENELITIAN

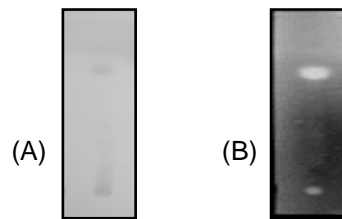
Uji Kualitatif Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Keberadaan flavonoid ditandai dengan pepadaman pada UV 254 sedangkan di bawah sinar UV 365, flavonoid akan berfluoresensi kuning, biru atau hijau tergantung dari strukturnya (Wagner and Bladt, 1996). Dari hasil pemeriksaan terlihat bercak senyawa golongan flavonoid terdapat dalam ekstrak etanolik kulit buah *Citrus reticulata* (Gambar 1).

Hasil Uji Sitotoksik

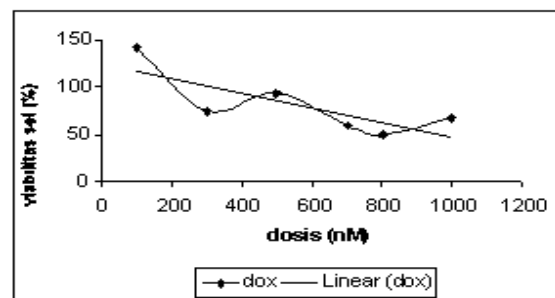
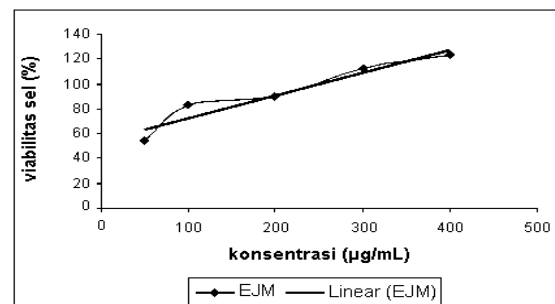
Perlakuan ekstrak etanolik kulit buah

jeruk Mandarin (EJM) sebagai agen tunggal justru menimbulkan proliferasi (pertumbuhan sel) MCF-7 dengan efek yang bergantung pada konsentrasi (Gambar 2). Namun, uji kombinasi terapi tetap dilaksanakan untuk mengetahui kemungkinan efikasi kombinasi EJM-Dox terhadap pertumbuhan sel MCF-7. Hasilnya menunjukkan bahwa penggunaan EJM pada perlakuan Dox dosis tinggi (500 dan 700 nM) relatif tidak mengakibatkan peningkatan proliferasi sel. Tetapi, dilihat dari sisi penggunaan EJM pada dosis Dox yang rendah (100 dan 250 nM), efek proliferasi EJM lebih dominan dibandingkan penghambatan oleh Dox (Gambar 3).



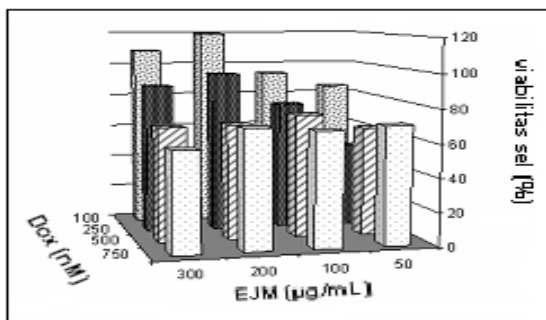
Gambar 1—Keberadaan flavonoid secara kualitatif dengan uji KLT. Terlihat bahwa terdapat 1 bercak yang menyebabkan pepadaman di UV 254 (A) dan fluoresensi di UV 366 (B). Jarak elusi yang digunakan 10 cm.

Hasil foto sel memperlihatkan morfologi MCF-7 pada EJM hampir menyamai kontrol sel (sel yang hidup tetap banyak) (Gambar 4). Berdasarkan data-data yang didapat di atas, maka tidak dilakukan perhitungan indeks kombinasi EJM-Dox terhadap sel MCF-7 sebagaimana yang direncanakan sebelumnya.



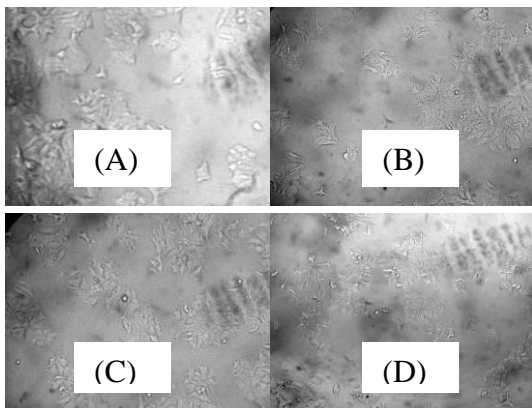
Gambar 2—Profil perbedaan gambaran kehidupan sel MCF-7 akibat perlakuan EJM dan Dox sebagai agen tunggal.

Untuk melihat efikasi EJM maupun Dox pada sel MCF-7, sel ditanam sebanyak 3000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran, diinkubasi 48 jam kemudian diberi perlakuan baik dengan EJM (50-400 µg/ml) maupun Dox (100-1000 nM) (dalam bentuk tunggal), kemudian diinkubasi lagi selama 48 jam sebagaimana dijelaskan dalam metodologi. Persen sel hidup didapat dari konversi nilai absorbansi kristal formazan yang terbentuk akibat perlakuan MTT seperti yang dijelaskan pada metodologi. EJM justru menyebabkan pertumbuhan sel sebesar 53-123%, berkebalikan dengan Dox yang menyebabkan penghambatan sel sebesar 49-141% (IC₅₀ 959 nM). Data didapat dari rata-rata tiga percobaan.



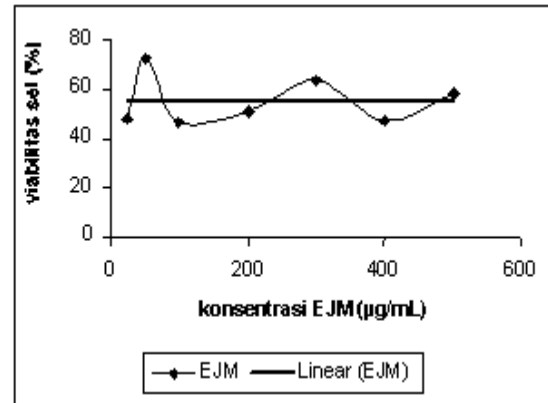
Gambar 3—Profil perlakuan kombinasi EJM-Dox terhadap sel MCF-7.

Untuk melihat efikasi EJM dan Dox pada sel MCF-7 sebagai kombinasi terapi, sel ditanam sebanyak 3000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran, diinkubasi selama 48 jam, kemudian diberi perlakuan kombinasi sebagaimana dijelaskan dalam metodologi. EJM menyebabkan proliferasi yang meningkat pada dosis Dox 100 dan 250 nM, namun relatif tidak memiliki pengaruh pada perlakuan Dox dosis 500 dan 700 nM. Data didapat dari rata-rata tiga percobaan.



Gambar 4—Morfologi sel MCF-7 setelah perlakuan EJM (A), Dox (B), kombinasi EJM-Dox (C) dibandingkan dengan kontrol sel (D). Sel yang mati terlihat bening dan membulat. Terlihat bahwa morfologi sel dengan perlakuan EJM hampir sama dengan kontrol sel (sel yang hidup masih banyak). Gambar diambil dengan perbesaran 40x.

Penelitian tambahan terhadap sel lain (T47D) juga dilakukan sebagai data pembandingan terhadap hasil EJM terhadap MCF-7. Hasilnya menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi EJM relatif tidak memberikan peningkatan terhadap pertumbuhan sel T47D (Gambar 4).



Gambar 5—Perlakuan EJM sebagai agen tunggal terhadap sel T47D tidak menunjukkan efek proliferasi seperti pada perlakuan EJM terhadap sel MCF-7.

Untuk melihat efikasi EJM pada sel T47D, sel ditanam sebanyak 3000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran, diinkubasi 48 jam kemudian diberi perlakuan baik dengan EJM (25-500 µg/ml), kemudian diinkubasi lagi selama 48 jam sebagaimana dijelaskan dalam metodologi. Data didapat dari rata-rata tiga percobaan.

PEMBAHASAN

Penggunaan doxorubicin (Dox) dalam klinik dibatasi karena menyebabkan efek samping yang meningkat seiring meningkatnya dosis (Tyagi, *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil penelitian retrospektif diketahui bahwa toksisitas kardiak akibat pemberian Dox merupakan efek samping yang bergantung pada dosis (Wattanapitayakul, *et al.*, 2005). Selain toksis terhadap jaringan normal, Dox juga diketahui mampu menyebabkan timbulnya resistensi sel tumor terhadap obat, di antaranya adalah resistensi sel MCF-7 terhadap Dox. Berbagai mekanisme yang memperantarainya antara lain adalah inaktivasi obat, pengeluaran obat oleh pompa pada membran sel, mutasi pada target obat serta kegagalan inisiasi apoptosis (Notarbartolo, *et al.*, 2005 dan Davis, *et al.*, 2003). Walaupun demikian, Dox tetap digunakan sebagai agen kemoterapi terhadap MCF-7 karena saat ini menjadi obat pilihan untuk kemoterapi dan sebagai kombinasinya digunakan ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin (EJM) yang mengandung flavonoid tangeretin, sehingga diharapkan apabila terjadi efek yang sinergis dengan EJM, efikasi Dox

tetap dapat meningkat dengan dosis kecil, sehingga toksisitas dan efek sampingnya terhadap sel normal dapat ditekan. Diharapkan, apabila terjadi sinergisitas antara EJM dan Dox, akan didapatkan model terapi kanker payudara yang jauh lebih baik dari sebelumnya, melalui kombinasi EJM-Dox.

Tetapi, fakta hasil penelitian menunjukkan hasil yang sama sekali berbeda dengan hipotesis awal. Perlakuan EJM terhadap sel MCF-7 justru menimbulkan proliferasi yang meningkat seiring meningkatnya konsentrasi EJM yang digunakan. Beberapa kemungkinan dapat dimunculkan dari hasil ini, di antaranya adalah kemungkinan EJM bersifat estrogenik dan kemungkinan lain adalah adanya kandungan flavonoid lain yang bersifat antiapoptosis, seperti naringin dalam konsentrasi yang lebih tinggi dari flavonoid tangeretin (Choi, *et al.*, 2007).

Sifat estrogenik EJM dimungkinkan karena MCF-7 merupakan *cell line* yang mengekspresi reseptor estrogen α (ER- α) sangat tinggi. Jika banyak reseptor estrogen yang terekspresi, ditambah dugaan sifat estrogenik EJM pada kadar rendah, maka tidak mengherankan apabila terjadi proliferasi sel MCF-7 yang meningkat seiring meningkatnya kadar EJM, karena terbentuknya protein-protein untuk proliferasi adalah salah satu dampak estrogenik yang ditimbulkan apabila suatu senyawaan yang bersifat estrogenik terkomplemen dengan reseptor estrogen. Sedangkan dugaan lain yang mungkin adalah karena kandungan flavonoid lain pada konsentrasi uji belum mampu menyebabkan apoptosis. Untuk membuktikan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lain yang lebih spesifik. Caranya adalah dengan kuantifikasi kadar tangeretin dan flavonoid lain pada EJM yang digunakan, sehingga dapat diketahui secara pasti kandungan tangeretin maupun flavonoid lain pada kulit jeruk. Bila kandungannya kecil, maka tidak mengherankan apabila pada kadar yang rendah EJM bersifat estrogenik karena mungkin senyawaan yang bersifat estrogenik lebih dominan jika dibandingkan dengan tangeretin yang bersifat sitotoksik. Juga perlu dilakukan penelitian kemungkinan aksi sitotoksik EJM pada kadar tinggi sebagaimana aksi genistein.

Namun, terlepas dari semua itu, terbukti bahwa sel MCF-7 adalah sel yang tergolong resisten terhadap Dox. Terlihat walaupun Dox diberikan dalam kisaran dosis yang relatif tinggi (100-1000 nM), namun penghambatan sel yang terjadi tidak terlalu besar. Namun demikian, dengan meningkatnya konsentrasi Dox, absorbansi rata-rata relatif menurun yang berarti pula bahwa viabilitas sel menurun. Sedangkan pada

EJM, absorbansi rata-rata justru meningkat seiring peningkatan dosis yang berarti pula bahwa viabilitas sel meningkat.

Peneliti kemudian ingin membuktikan lebih lanjut mengenai dugaan estrogenik dari EJM. Caranya, dengan membandingkan hasil perlakuan EJM di atas dengan perlakuan EJM pada *cell line* yang berbeda, yaitu T47D. Diketahui bahwa T47D adalah *cell line* yang berasal dari epitelial, di daerah duktus payudara yang sedikit atau sangat lemah mengekspresi reseptor estrogen β (ER- β). Bila sifat estrogenik EJM memang ada, maka pada T47D tidak akan terjadi kenaikan proliferasi yang signifikan seperti halnya pada MCF-7, karena reseptor estrogen yang tersedia juga sedikit. Hasilnya sesuai harapan. Percobaan yang dilakukan pada T47D dengan perlakuan EJM tidak menimbulkan peningkatan penghambatan sel secara signifikan seiring peningkatan dosis. Hasil yang berbeda diduga disebabkan perbedaan karakteristik dari masing-masing sel dalam mengekspresi reseptor estrogen. Terlihat bahwa EJM yang diduga bersifat estrogenik tidak terlalu berpengaruh untuk sel T47D yang mengekspresi reseptor estrogen jauh lebih rendah dibanding MCF-7. Ini berarti, dugaan estrogenik EJM semakin diperkuat.

Kemudian, tetap dilakukan perlakuan kombinasi EJM-Dox sesuai prosedur awal. Hanya saja, tujuan kali ini bukanlah untuk melihat efek sitotoksik gabungan keduanya seperti pada awalnya, namun untuk mengetahui apakah sifat proliferasi EJM tetap akan tampak pada perlakuan Dox pada MCF-7. Jika sifat proliferasi EJM tetap tampak, sel yang terpapar kombinasi tersebut akan meningkatkan viabilitasnya seiring dengan penambahan kadar EJM.

Namun, hasil percobaan memperlihatkan bahwa peningkatan kadar EJM pada kombinasi dengan Dox dosis 500 dan 700 nM tidak menyebabkan peningkatan viabilitas sel. Ini berarti, EJM tidak memiliki pengaruh terhadap Dox dosis 500 dan 700 nM. Tetapi, pada dosis Dox 100 dan 250 nM, efek proliferasi EJM lebih dominan, ditunjukkan dengan meningkatnya viabilitas sel seiring meningkatnya konsentrasi EJM, walaupun di sana terdapat pula Dox sebagai agen kemoterapi. Ini menunjukkan bahwa EJM memiliki efek proliferasi yang cukup kuat, karena tetap dapat menimbulkan proliferasi sel walaupun digunakan bersamaan dengan suatu agen sitotoksik.

Hal ini membuka tabir gagasan lain penelitian dan pemanfaatan EJM di masa mendatang. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penyebab pasti munculnya sifat estrogenik EJM pada kadar yang rendah,

misalnya adanya kemungkinan kadar tangeretin yang sangat rendah pada EJM untuk dapat berefek sitotoksik.

tunggal maupun kombinasi dengan Doxorubicin (Dox) dosis 100 dan 250 nM.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik kulit buah jeruk Mandarin (EJM) justru mampu menaikkan proliferasi seiring meningkatnya konsentrasi pada sel MCF-7 ketika diberikan dalam bentuk

UCAPAN TERIMA KASIH

DP2M DIKTI sebagai pemberi dana pelaksanaan penelitian, dan segenap pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Adams, L.S., Seeram, N.P., Hardy, M.L., Carpenter, C., dan Heber, D., 2006, Analysis of the Interactions of Botanical Extract Combinations Against the Viability of Prostate Cancer Cell Lines, *eCAM*, **3**(1) 117–124

Middleton, E. Jr. and 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

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review*, **23**(4): 519–534

Nelson, E.K., 1934, The Occurrence of Pentamethyl Flavonol in Tangerine Peel, *J. Am. Chem. Soc.*, 56

Pan, M.H., Chen, W.J., Shiao, S.Y.L., Ho, C.T., and Lin, J.K., 2002, Tangeretin Induces Cell Cycle G1 Arrest Through Inhibiting Cyclin-Dependent Kinases 2 and 4 Activities As Well As Elevating Cdk Inhibitor p21 and p27 in Human Colorectal Carcinoma Cells', *Carcinogenesis*, **23**, (10), 1677–1684

Slambrouck, V., Parmar, V.S., Sharma, S.K., Bondt, D., Fore, Coopman, Vanhoecke, Boterberg, Depypere, Leclercg, and Bracke, 2005, Tangeretin Inhibits Extracellular-Signal-Regulated Kinase (ERK) Phosphorylation', *FEBS Lett.* **14;579(7):**1665–9

Bracke, M., Bruyneel, E.A., Vermeulen, S.J., Vennekens, K., Marck, V.V., dan Mareel, M.M., 1994, Citrus Flavonoid Effect on Tumor Invasion and Metastasis, *Food Technol.*, 48

Wagner, H., dan Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis The Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd Ed., Springer Verlag, Berlin

Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., Alessandro, N., 2005, Antitumor Effects of Curcumin, Alone or in Combination With Cisplatin or Doxorubicin, on Human Hepatic Cancer Cells, Analysis of Their Possible Relationship to Changes in NF- κ B Activation Levels and in AIAP Gene Expression, *Cancer Letter*, **224**: 53–65

Tyagi, A.K., Agarwal, C., Chan, D.C.F., Agarwal, R., 2004, Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells, *Oncology Reports*, **11**:493–499

Wattanapitayakul, S.K., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsukul, S., Bauer, J.A., 2005, Screening of Antioxidants from Medicinal Plants for Cardioprotective Effect against Doxorubicin Toxicity, *Basic & Clinical Pharmacol. & Toxicol.*, **96**: 80

Davis, J.M., Navolanic, P.M., Weinstein-Oppenheimer, C.R., Steelman, L.S., Wei H., Konopleva, M., Blagosklonny, M.V., McCubrey, J.A., 2003, Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance, *Clinical Cancer Research*, **9**, 116–1170

Choi, S.Y., Ko, H.C., Ko, S.Y., Hwang, J.H., Park, J.G., Kang, S.H., 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