

Efek Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (*Citrus Reticulata*) terhadap *Cell-Cycle G1 Arrest* dan *Apoptosis* pada Sel Kultur Retinoblastoma

Citrus Peel Extract (Citrus reticulata) Effect on Cell-Cycle G1 Arrest and Apoptosis in Retinoblastoma Cell Culture

Syarifah Rohaya¹, Hariwati¹, Lely Retno W¹, Hidayat Sujuti²

¹Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

²Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Retinoblastoma adalah kanker intraokular yang terjadi pada anak usia dini, disebabkan oleh terganggunya supresor tumor gen RB baik secara hereditas maupun nonhereditas. Tatalaksananya adalah enukleasi, eksentrisasi, kemoterapi, laser fotokoagulasi, *cryotherapy*, dan radioterapi. Apabila tidak diobati hampir seluruh pasien mengalami proses desak ruang dan penyebaran tumor. Kemoterapi bukan merupakan pilihan terapi selektif karena hal ini semakin merusak sel normal pada jaringan yang normal. Sehingga peneliti mencari alternatif terapi seperti ekstrak kulit jeruk keprok yang memiliki fungsi sebagai anti karsinogenik, anti tumor, anti invasif dan anti metastasis. Penelitian ini merupakan analitik eksperimental pada sel kultur retinoblastoma yang dipapar dengan ekstrak kulit jeruk keprok. Sel kultur retinoblastoma dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kultur+ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL, kultur+ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/mL dan kultur+ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL. Diinkubasi selama 72 jam lalu dilakukan pengecatan dengan *propidium iodide* untuk diperiksa menggunakan *flowcitometry*. Hasil pemeriksaan dengan *flowcitometry* berupa gambaran histogram dari siklus sel dan *apoptosis*. Sel kultur retinoblastoma pada fase G1/S, kelompok kontrol (15,03±3,03), kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL (12,47±2,51), 20mg/mL (12,30±1,33) dan 40mg/mL (10,80±1,52) ($p=0,027$) menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk keprok tidak menginduksi G1 *arrest*. Pada data *apoptosis*, kelompok kontrol (35,0±3,96), kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL (33,63±0,88), 20mg/mL (38,48±8,96) dan 40mg/mL (64,42±2,09) ($p=0,000$) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit jeruk keprok menginduksi *apoptosis* pada sel kultur retinoblastoma. Kulit buah jeruk keprok (*Citrus reticulata*) mengandung berbagai macam senyawa *flavonoid*, yang bertindak sebagai anti-karsinogenik, anti-tumor, anti-invasif dan anti-metastasis. Pemberian ekstrak kulit jeruk keprok tidak menginduksi *cell-cycle G1 arrest* tetapi menginduksi proses *apoptosis*.

Kata Kunci: *Apoptosis*, *cell-cycle G1 arrest*, ekstrak kulit jeruk keprok (*Citrus reticulata*), sel kultur retinoblastoma

ABSTRACT

*Retinoblastoma, an intraocular cancer occurring in early childhood, is caused by disruption in the tumor suppressor RB gene and can occur either hereditary or nonhereditary. The management involves enucleation, exenteration, chemotherapy, laser photocoagulation, cryotherapy and radiotherapy. If left untreated, almost all patients experience intracranial extension and disseminated disease. Chemotherapeutic agents are usually nonselective because these agents also damage normal cells in normal tissues. Therefore, the researchers search an alternative therapy such as citrus peel extract that has function as anti-carcinogenic, anti-tumor, anti-invasive, and anti-metastasis. This study is an experimental study on retinoblastoma cell cultures that are exposed to citrus peel extract. The retinoblastoma cell culture was divided in 4 groups, namely control group, cell culture + 10mg/ml citrus peel extract, cell culture + 20mg/ml citrus peel extract, and cell culture + 40mg/ml citrus peel extract. All groups were incubated for 72 hours and propidium iodide staining was performed for flowcytometry analysis. The examination results through flowcytometry were histogram of cell cycle and apoptosis. Retinoblastoma cell culture in G1/S phase, control group (15,03±3,03), 10mg/ml citrus peel extract (12,47±2,51), 20mg/ml citrus peel extract (12,30±1,33) and 40mg/ml citrus peel extract (10,80±1,52) with significant value 0,027 ($p < 0,05$) show that citrus peel extract do not induce G1 arrest. On apoptosis data, control group (35,0±3,96), 10mg/ml citrus peel extract (33,63±0,88), 20mg/ml citrus peel extract (38,48±8,96) and 40mg/ml citrus peel extract (64,42±2,09) ($p=0,000$) show that citrus peel extract can induce apoptosis in retinoblastoma cell culture. Citrus peel (*Citrus reticulata*) consist of flavonoids that act as anti-carcinogenic, anti-tumor, anti-invasive and anti-metastasis. Citrus peel extract do not induce of cell-cycle G1 arrest but induce apoptosis process.*

Keywords: *Apoptosis*, *cell-cycle G1 arrest*, citrus peel extract (*Citrus reticulata*), human retinoblastoma cell culture

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 2, Agustus 2014; Korespondensi: Syarifah Rohaya. Bagian Ilmu Kesehatan Mata Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto No. 2 Malang Tel. (0341) 366242 Email: syarifah_rohaya@yahoo.com

PENDAHULUAN

Retinoblastoma merupakan kasus tumor pada anak-anak yang berakibat fatal, sebanyak 2/3 kasus muncul sebelum akhir tahun ketiga. Tumor bersifat bilateral pada sekitar 30% kasus. Kasus-kasus ini bersifat herediter. Retinoblastoma bilateral secara khas didiagnosa pada tahun pertama kehidupan dan pada kasus unilateral didiagnosa pada umur antara 1-3 tahun (1,2).

Gambaran klinis retinoblastoma yang sering muncul adalah leukokoria (*white pupillary reflex*), strabismus dan inflamasi okular. Gambaran klinis lain yang mungkin tampak antara lain *heterochromia iris*, hifema, perdarahan vitreous, selulitis orbita, glaukoma, proptosis dan hipopion (3,4). Kegagalan diagnosa pada stadium awal akan menyebabkan kebutaan, deformitas kosmetik yang permanen dan pada kasus yang berat akan menyebabkan kematian, sehingga harus tanggap terhadap gejala dini retinoblastoma. Diagnosis dini dan pengobatan yang adekuat pada tumor yang masih terbatas intraokular dapat menghasilkan *survival rate* 90%-95%. Tanpa pengobatan, tumor ini akan berekstensi ke ekstraokular dan mempunyai prognosis yang buruk (5).

Penatalaksanaan retinoblastoma bertujuan untuk menyelamatkan jiwa penderita dan mempertahankan bola mata. Pilihan penatalaksanaan retinoblastoma sampai saat ini meliputi enukleasi, eksenterasi, kemoterapi, laser fotokoagulasi, krioterapi, *external-beam radiation* dan *plaque radiotherapy*. Pada kasus-kasus retinoblastoma yang telah mengalami metastase, sudah menyebar ke orbita atau nervus optikus maka dilakukan kemoterapi. Agen anti kanker ini memiliki rentang index terapi yang sempit sehingga memungkinkan timbulnya toksisitas pada jaringan normal (6).

Kulit buah jeruk keprok (*Citrus reticulata*) mempunyai berbagai macam senyawa *flavonoid* yang berpotensi sebagai agen kemopreventif. Golongan senyawa ini diketahui memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas mencakup aktivitasnya sebagai anti-karsinogenik, anti-tumor, anti-invasif dan anti-metastasis. Kelompok senyawa *flavonoid* ini mengandung *tangeretin*, *nobiletin*, *hesperidin*, *hesperetin* dan *naringin* (7-9).

Tangeretin dan *nobiletin* dikatakan dapat menginduksi *cell-cycle G1 arrest* pada sel kanker kolon COLO 205 dan sel kanker payudara T47D dengan cara menghambat pada target Cdk 4 dan Cdk 2. Selain itu, *tangeretin* dalam buah jeruk dapat menginduksi *apoptosis* pada sel leukemia HL-60 (10-14). *Tangeretin* dan *nobiletin* bersifat sitostatik, yaitu menghambat pertumbuhan sel tumor dan tidak bersifat toksik terhadap jaringan normal (13,15,16). Kedua polimetoksi flavonoid ini bekerja menghambat proliferasi kultur sel dari karsinoma sel skuamosa, gliosarkoma, leukemia, melanoma, kanker kolorektal, kanker gaster dan kanker paru. Selain itu juga dilaporkan bahwa *tangeretin* dan *nobiletin* dapat menurunkan insiden tumor pada tikus. Secara *in vivo*, *tangeretin* dan *nobiletin* terbukti aman dalam mencegah terjadinya tumor. Sedangkan secara *in vitro*, *tangeretin* dan *nobiletin* terbukti dapat meningkatkan ikatan antar sel serta menghambat proliferasi pada sel kanker payudara MCF-7/6 (10).

Berdasarkan pada paparan diatas, peneliti ingin melakukan penelitian ekstrak kulit jeruk keprok (*Citrus reticulata*) terhadap sel retinoblastoma karena penelitian

pada sel retinoblastoma merupakan penelitian awal. Sel kultur retinoblastoma dipapar dengan beberapa dosis ekstrak kulit jeruk keprok untuk mengetahui efeknya terhadap *cell-cycle G1 arrest* dan *apoptosis* pada sel kultur retinoblastoma.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro*, yaitu kultur sel jaringan retinoblastoma yang dipapar dengan ekstrak kulit jeruk keprok (*Citrus reticulata*). Subjek penelitian adalah jaringan retinoblastoma yang diambil dari penderita retinoblastoma di RSUD dr.Saiful Anwar Malang. Kultur sel retinoblastoma dibagi dalam 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (tidak mendapatkan paparan apapun), kelompok perlakuan 1 (paparan ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL), kelompok perlakuan 2 (paparan ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/mL) dan kelompok perlakuan 3 (paparan ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL). Keempat kelompok ini diamati setelah 72 jam.

Dosis ekstrak kulit jeruk keprok (mg/mL) dihitung dengan menggunakan rumus: $(g \text{ solute}) / 1 \text{ mole} \times (\text{mole}) / L \times (L)$ atau $FW \times \text{molarity} \times \text{volume}$. Dosis ekstrak kulit jeruk keprok yang diberikan ditentukan berdasarkan "*dose doubling design*", yaitu 10mg/mL, 20mg/mL dan 40mg/mL.

Kultur Jaringan Sel Retinoblastoma

Jaringan sel retinoblastoma dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali didalam laminar *flow*. Jaringan dicacah dalam media serum free hingga berukuran 1x1 mm. Suspensi jaringan (*centrifuge*) diputar dengan kecepatan 1200rpm selama 7 menit. Supernatan dibuang sedangkan pellet diresuspensi dengan serum *free* dan dipipetting. Suspensi jaringan (*centrifuge*) diputar dengan kecepatan 1200 rpm selama 7 menit. Supernatan dibuang sedangkan pellet diresuspensi dengan media kultur dan dipipetting. Jaringan dimasukkan ke dalam plate kultur dan diinkubasi pada suhu 37°C, kelembaban udara 95%, dan 5% CO₂ selama 24 jam.

Ekstrak Kulit Jeruk Keprok

Kulit jeruk keprok yang akan dikeringkan dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil. Selanjutnya dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering. Setelah kering, diblender sampai halus, ditimbang sebanyak 100gr. Dimasukkan 100gr kulit jeruk keprok kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter, kemudian direndam dengan etanol sampai volume 1000ml. Kocok sampai benar-benar tercampur. Didiamkan 1 malam sampai mengendap. Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil. Dimasukkan dalam labu evaporator 1 liter. Pasang labu evaporator pada evaporator. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh. Biarkan larutan etanol memisahkan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/5 dari kulit jeruk keprok yang sudah dikeringkan. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik/kaca dan disimpan dalam *freezer*.

Dosis Ekstrak Kulit Jeruk Keprok

Pembuatan dosis ekstrak kulit jeruk keprok didahului dengan pembuatan larutan, yaitu larutan ekstrak kulit jeruk keprok yang telah diencerkan dengan air hingga

homogen. Buat larutan stok sebanyak 500mg/mL. Sebanyak 500mg ekstrak kulit jeruk keprok diencerkan dengan 5mL air. Rumus yang digunakan: $V1.M1=V2.M2$, V1 adalah volume larutan sebelum pengenceran, M1 adalah molaritas larutan sebelum pengenceran, V2 adalah volume larutan setelah pengenceran dan M2 adalah molaritas larutan setelah pengenceran. Kemudian larutan ekstrak ini dicampur dengan DMEM dan diteteskan pada kelompok perlakuan.

Perlakuan Sel Kultur Jaringan Retinoblastoma

Sel kultur didalam plate kultur ditetesi dengan tripsin-EDTA sehingga sel kultur dapat lepas dari plate kultur. Kemudian dilakukan *centrifuge*. Setelah itu supernatan dibuang, pellet dicampur dengan FBS. Kemudian lakukan resuspensi sampai homogen, ambil 100mL dan masukkan ke tiap *well*. Pada kelompok perlakuan, sel kultur ini dipapar dengan ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL, 20mg/mL dan 40mg/mL. Dilakukan analisa siklus sel fase G1/S dan *apoptosis* pada sel kultur retinoblastoma dengan menggunakan *flowcytometry* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 72 jam.

Cell Cycle Analysis dan Apoptosis Menggunakan Propidium Iodide (PI) Staining

Sel dikultur dalam 24 *well plate* dengan densitas 300,000 sel/*well* dalam 1 ml medium pertumbuhan. Beri 1 dan 2 mM AICAR, kemudian sel disentrifus pada kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Dicuci 2 kali dengan 1 ml PBS dingin. Tambahkan 2 ml ethanol dingin 75% pada saat sel divortex. Sel difiksasi 1 malam. Esok harinya, sel disentrifus lagi, kemudian dimasukkan ke dalam 2 ml PBS. Ditambahkan 100ml *DNase-free* (200ml/ml), *RNase A*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Ditambahkan 100ml PI, diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit. Sampel dibaca pada *flowcitometer* (BD FACSCalibur).

Rancangan Analisa Data

Pada penelitian ini digunakan uji *one-way ANOVA*, uji rentang ganda (*multiple comparison, Tukey*), uji korelasi dan uji regresi linier. Kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p < 0,05$. Data disajikan dalam bentuk tabulasi dengan menggunakan program SPSS 15.0 *for windows*.

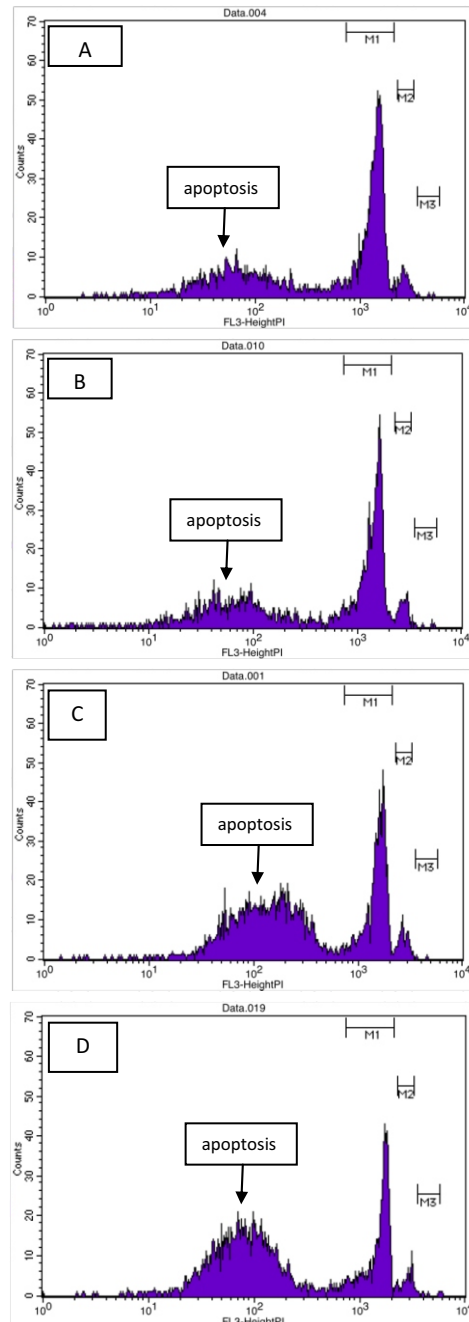
HASIL

Jaringan retinoblastoma yang masih heterogen dikultur dan dilakukan subkultur untuk mendapatkan sel-sel yang homogen. Pada hasil kultur tampak sel-sel retinoblastoma lebih kecil dan bulat (Gambar 1).



Gambar 1. Sel kultur retinoblastoma penderita, sel tampak homogen, lebih kecil dan lebih bulat (dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x)

Pada Gambar 2 tampak bahwa fase G1 (M1) memiliki tinggi yang hampir sama baik pada kelompok kontrol dan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL, sedangkan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/mL sedikit lebih rendah dari dosis 10mg/mL dan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL sedikit lebih rendah dari dosis 20mg/mL. Pada gambaran sub-G1 (*apoptosis*) tampak rendah pada kelompok kontrol dan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL, pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20 mg/mL dan 40 mg/mL tampak gambaran sub-G1 (*apoptosis*) yang lebih tinggi.



Gambar 2. Gambaran histogram pada kelompok perlakuan

Keterangan:

- a. Gambaran histogram sel kultur retinoblastoma pada kelompok kontrol
- b. Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/ml
- c. Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/ml
- d. Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/ml

Pada Gambar 2 didapatkan gambaran histogram sel kultur retinoblastoma pada kelompok kontrol pada fase G1 (M1) lebih tinggi (55,80%) dan gambaran apoptosis lebih rendah (34,95%). Pada gambaran histogram dengan perlakuan ekstrak kulit keprok dosis 10mg/ml fase G1 (M1) 54,82 % dengan apoptosis 33,63%. Pada perlakuan ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/ml sedikit lebih rendah dari dosis 10mg/mL (51,48%) dengan gambaran apoptosis yang lebih tinggi dari dosis 10mg/mL (38,48%), dan Gambaran histogram sel kultur retinoblastoma pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL fase G1 (M1) paling rendah dari seluruh perlakuan (27,46%) dengan gambaran apoptosis yang paling tinggi (64,42%).

Pada Tabel 1 tampak bahwa fase G1/S pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL lebih rendah daripada kelompok kontrol. Kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/mL sedikit mengalami penurunan bila dibandingkan dengan dosis 10mg/mL. Pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL pada fase G1/S mengalami penurunan yang lebih besar.

Tabel 1. Distribusi sel kultur retinoblastoma pada fase G1/S dan apoptosis sel kultur retinoblastoma

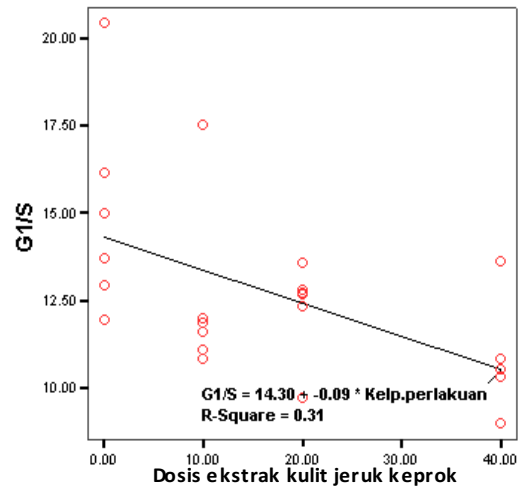
Perlakuan Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (Dosis)	Distribusi Sel Kultur Retinoblastomapada Fase G1/S	Apoptosis Sel Kultur Retinoblastoma
Kontrol	15,03±3,03	35,0±3,96
Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10 mg/mL	12,47±2,51	33,63±0,88
Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20 mg/mL	12,30±1,33	38,48±8,96
Ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40 mg/mL	10,80±1,52	64,42±2,09
	p-value=0,027	p-value=0,000

Berdasarkan hasil uji *one-way* ANOVA dikatakan adanya perbedaan yang signifikan antara efek pemberian ekstrak kulit jeruk keprok dengan jumlah sel pada fase G1/S ($p=0,027$). Dari hasil uji *Tukey* didapatkan bahwa kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL dan 20mg/mL tidak berbeda signifikan dari kelompok kontrol ($p=0,221$ dan $p=0,175$), sedangkan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL berbeda signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,017$).

Pada Kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL, jumlah sel yang mengalami *apoptosis* sedikit menurun bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sebaliknya pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 20mg/mL mulai didapatkan peningkatan jumlah sel yang *apoptosis* daripada kelompok kontrol. Pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL, jumlah sel yang mengalami *apoptosis* makin meningkat.

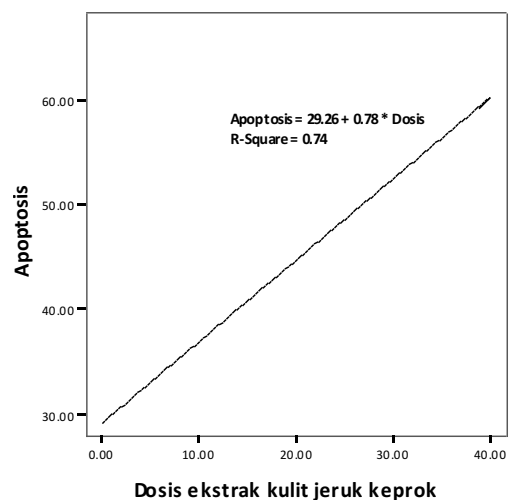
Dari uji *one-way* ANOVA didapatkan perbedaan yang signifikan antara efek pemberian ekstrak kulit jeruk keprok dengan jumlah sel yang *apoptosis* ($p=0,000$). Dari hasil uji *Tukey*, pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 10mg/mL dan 20mg/mL tidak berbeda signifikan ($p=0,965$ dan $p=0,634$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sebaliknya antara kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL memiliki perbedaan yang signifikan ($p=0,000$).

Dari uji korelasi didapatkan nilai $r=-0,554$ dan $p=0,002$ maka dapat dikatakan bahwa peningkatan dosis ekstrak kulit jeruk keprok akan menyebabkan penurunan G1/S kultur retinoblastoma. Pada uji regresi didapatkan hasil bahwa 1mg/mL ekstrak kulit jeruk keprok dapat menurunkan G1/S kultur retinoblastoma sebesar 0,095. Sekitar 30,7% penurunan jumlah sel kultur retinoblastoma pada fase G1/S dipengaruhi oleh faktor ekstrak kulit jeruk keprok.



Gambar 3. Grafik linieritas ekstrak kulit jeruk keprok terhadap jumlah sel kultur retinoblastoma pada fase G1/S

Dari hasil uji korelasi antara ekstrak kulit jeruk keprok dengan *apoptosis* didapatkan adanya hubungan antara ekstrak kulit jeruk keprok dengan *apoptosis* ($r=0,861$, $p=0,002$), semakin tinggi dosis ekstrak kulit jeruk keprok maka jumlah sel yang *apoptosis* akan makin meningkat. Berdasarkan uji regresi dikatakan bahwa setiap 1mg/mL ekstrak kulit jeruk keprok dapat meningkatkan *apoptosis* sebesar 0,778. Selain itu, ekstrak kulit jeruk keprok memiliki pengaruh yang besar terhadap *apoptosis* yaitu sebesar 74,1%.



Gambar 4. Grafik linieritas antara ekstrak kulit jeruk keprok dengan apoptosis pada sel kultur retinoblastoma

DISKUSI

Hasil dari penelitian ini didapatkan jumlah sel pada fase G1/S yang menurun setelah terpapar ekstrak kulit jeruk keprok. Hal ini menandakan adanya penurunan jumlah sel yang masuk ke fase S untuk melakukan sintesa DNA. Penurunan jumlah sel ini dapat disebabkan oleh proses *apoptosis* atau *cell-cycle G1 arrest*. Pan melakukan penelitian *tangeretin* terhadap sel karsinoma kolorektal manusia (COLO 205) dan didapatkan hasil adanya *cell-cycle G1 arrest*. Protein-protein yang berperan dalam meregulasi fase G1/S adalah Cdk 2, Cdk 4, Cdk inhibitor p21 dan p27. Pada penelitian ini terbukti bahwa *tangeretin* dapat menurunkan aktivitas Cdk 2 dan Cdk 4 dalam 48 jam serta dapat meningkatkan aktivitas Cdk inhibitor p21 dan p27 sehingga dapat menginduksi terjadinya *cell-cycle G1 arrest*. Hambatan terhadap aktivitas Cdk 2 dan Cdk 4 menyebabkan jumlah sel karsinoma pada fase G1 meningkat, sedangkan pada fase S dan G2/M jumlah sel karsinomanya mengalami penurunan. Pada penelitian kami memberikan hasil yang berbeda dari hasil penelitian Pan yaitu jumlah sel pada fase G1 dan S menurun sehingga dapat dikatakan bahwa *cell-cycle G1 arrest* tidak terjadi tetapi terjadi proses *apoptosis*. Hal ini tampak pada hasil *flowcytometry* dimana didapatkan sel yang mengalami *apoptosis* pada kelompok ekstrak kulit jeruk keprok dosis 40mg/mL lebih banyak jumlahnya daripada kelompok kontrol (13,14).

Hirano melakukan penelitian *tangeretin* terhadap sel leukemia HL-60 dan didapatkan hasil bahwa *tangeretin* dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia HL-60 melalui proses *apoptosis*. *Apoptosis* ini terjadi 24 jam setelah terpapar *tangeretin*. Efek *tangeretin* ini dapat menyebabkan defragmentasi DNA dan hambatan pertumbuhan yang ditandai dengan adanya ion seng (Zn^{2+}) dan dapat menghambat aktivitas Ca^{2+} -dependent *endonuclease*. Kematian sel yang diinduksi oleh ion kalsium (Ca^{2+}) tergantung pada peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler sehingga akan menyebabkan terjadinya proses nekrosis. Konsentrasi ion kalsium intraseluler yang lebih rendah akan menyebabkan kematian sel melalui proses *apoptosis*. Kerusakan atau defragmentasi DNA terjadi sebagai akibat dari adanya

perubahan konsentrasi ion kalsium intraseluler yang bersifat sitotoksik sehingga dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi dari *mitochondria*. Disfungsi *mitochondria* ditandai dengan adanya kerusakan dari potensial *mitochondria transmembrane* dan terbukanya *permeability transition pores* dari *mitochondria*. Sehingga melepaskan berbagai macam protein ke dalam sitosol misalnya sitokrom c yang berfungsi untuk mengaktifkan caspase-9. Selanjutnya *caspase-9* akan mengaktifkan *caspase-3* dan caspase eksekusioner lain yaitu *caspase-6* dan *caspase-7*. Dengan teraktivasi caspase eksekusioner akan mengaktifkan jalur *apoptosis* (12).

Kulit buah jeruk keprok (*Citrus reticulata*) mengandung berbagai macam senyawa *flavonoid*. *Flavonoid* diketahui memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas mencakup aktivitasnya sebagai anti-karsinogenik, anti-tumor, anti-invasif dan anti-metastasis. Kelompok senyawa *flavonoid* ini mengandung *tangeretin*, *nobiletin*, *hesperidin*, *hesperetin* dan *naringin*. *Tangeretin* merupakan *flavonoid* utama pada kulit jeruk keprok, yaitu sekitar 87,5%. Penelitian yang dilakukan oleh Karen terhadap *tangeretin* dan *nobiletin* pada *cell line* kanker kolon dan payudara, disimpulkan bahwa *tangeretin* dan *nobiletin* dapat menghambat 50-70% proliferasi sel tumor dan menginduksi terjadinya *G1 arrest*. Sebaliknya hasil penelitian yang dilakukan oleh Hirano (1995) menyatakan bahwa *tangeretin* dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia HL-60 melalui proses *apoptosis*. *Nobiletin* dilaporkan juga memiliki efek imunomodulator, anti inflamasi, menghambat sel kanker mammae manusia, anti hepatitis C virus. *Hesperidin* bekerja meningkatkan integritas vascular, menurunkan permeabilitas kapiler, menurunkan kadar kolesterol dan anti kanker. *Naringin* dapat menurunkan kadar kolesterol, anti kanker, pada tikus terbukti sebagai antiulcer pada lesi gaster yang diinduksi etanol. *Tangeretin*, *nobiletin*, *naringin* dan *hesperidin* dilaporkan memiliki efek kemopreventif melalui modulasi aktivitas CYP1A2. Pada penelitian yang kami lakukan, zat-zat aktif ini tidak diekstrak secara terpisah karena tidak tersedianya sarana dan biaya yang mahal. Hal ini merupakan kelemahan pada penelitian kami ini (8,10,15).

DAFTAR PUSTAKA

- Rosdiana N. *Retinoblastoma Familial*. Indonesian Journal of Cancer. 2009; 3(1): 33-36.
- Paduppai S. *Characteristic of Retinoblastoma Patients at Wahidin Sudirohusodo Hospital 2005-2010*. The Indonesian Journal of Medical Science. 2010; 2(1): 1-7.
- Raab EL. *Pediatric Ophthalmology and Strabismus in Basic and Clinical Science Course*. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2012; pp. 390-399.
- Rosdiana N. *Gambaran Klinis dan Laboratorium Retinoblastoma*. Sari Pediatri. 2011; 12(5): 319-322.
- Honavar. *Emerging Option in the Management of Advanced Intraocular Retinoblastoma*. British Journal of Ophthalmology. 2009; 93(7): 848-849.
- Shields CL and Shields JA. *Diagnosis and Management of Retinoblastoma*. Cancer Control. 2004; 11(5): 317-327.
- Perdana AN, Anita PD, Diah APKW, Sugeng R, dan Edy M. *Mekanisme Penekanan Ekspresi N-Ras Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (Citrus reticulata) sebagai Agen Kemopreventif*. Jurnal Farmasi Indonesia. 2009; 4(3): 104-115.
- Meiyanto E, Hermawan A, and Anindyajati. *Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012; 13(2): 427-436.
- Yunas SR, Latifah N, Rokhman MR, Fitriyanti A, dan Meiyanto Edy. *Penggunaan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Mandarin (Citrus reticulata) untuk Meningkatkan Sensitivitas Sel Kanker Payudara MCF-7 terhadap Agen Kemoterapi Doxorubicin*. Pharmacon. 2007; 8(2): 64-69.
- Morley KL, Ferguson PJ, and Koropatnick J. *Tangeretin and Nobiletin Induce G1 cell Cycle Arrest but Not Apoptosis in Human Breast and Colon Cancer Cells*. Cancer Letters. 2007; 251: 168-178.

11. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, and Lin JK. *Tangeretin Induces Cell-Cycle G1 Arrest Through Inhibiting Cyclin-Dependent Kinases 2 dan 4 Activities as Well as Elevating Cdk Inhibitors p21 and p27 in Human Colorectal Carcinoma Cells*. *Carcinogenesis*. 2002; 23(10): 1677-1684.
12. Hirano T, Abe K, Gotoh M, and Oka K. *Citrus Flavone Tangeretin Inhibits Leukaemic HL-60 Cell Growth Partially through Induction of Apoptosis with Less Cytotoxicity on Normal Lymphocytes*. *British Journal of Cancer*. 1995; 72(6): 1380-1388.
13. Pan MH and Ho CT. *Chemopreventive Effects of Natural Dietary Compounds on Cancer Development*. *Chem Soc Rev*. 2008; 37(11): 2558-2574.
14. Satsu H, Hiura Y, Mochizuki K, Hamada M, and Shimizu M. *Activation of Pregnane X Receptor and Induction of MDR1 by Dietary Phytochemicals*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(13): 5366-5373.
15. Lu Y, Zhang C, Bucheli P, and Wei D. *Citrus Flavonoids in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China*. *Plant Food for Human Nutrition*. 2006; 61(2): 57-65.