PENGARUH EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK MANDARIN (*Citrus reticulata*) DALAM MENGHAMBAT MIGRASI SEL KANKER KOLON WiDr SECARA IN VITRO

THE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF MANDARIN ORANGE PEEL (C*itrus reticulata*) IN INHIBITING COLON CANCER CELL (WiDr) MIGRATION IN VITRO.

Aulia Primasari
Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
primasariaulia@gmail.com

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer get 3rd place most frequently cancer in Indonesia. Various therapies have been used to treat cancer, but the costs incurred and the side effects caused by cancer therapy trigger us to find new breakthroughs to reduce colon cancer rate as soon as possible, one of them is natural resources. This study aims to find out the effect of ethanolic extract of Mandarin orange peel (*Citrus reticulata*) in inhibiting colon cancer (WiDr) migration in vitro.

Methods : "Laboratoric Quantitative Experimental". The series of studies included cytotoxicity analysis of ethanolic extract of Mandarin orange peel (*Citrus reticulata*) on WiDr cells using the MTT assay to determine cell viability and Migration Test using *scratch wound healing assay* to determine the percentage of cell closure (percentage of migration).

Results: Cytotoxicity test of ethanolic extract of Mandarin orange peel (*Citrus reticulata*) on WiDr cells gave IC_{50} values of 129.5 µg/ml which included moderate cytotoxic. Meanwhile, cell migration test within 36 hours using the s*cracth wound healing assay* method obtained the largest inhibition result of ethanolic extract of Mandarin orange peel (*Citrus reticulata*) at 3/2 IC50 dose or 194.25 µg / ml.

Conclusion: Ethanolic extract of Mandarin orange peel (*Citrus reticulate*) has an effect in inhibiting colon cancer cell (WiDr) migration so it can be used as chemoprevention which can prevent and inhibit cancer cell growth.

Keywords: *Citrus reticulata*, WiDr, migration.

INTISARI

Latar belakang: Kanker kolorektum menempati urutan nomer 3 dengan insiden kanker terbanyak di Indonesia. Berbagai terapi telah digunakan untuk mengobati kanker kolon, tetapi tingginya biaya yang dikeluarkan dan efek samping yang ditimbulkan dari terapi kanker memicu kita untuk menemukan suatu terobosan baru untuk menekan angka peningkatan kanker kolon sedini mungkin, salah satunya melalui sumber daya alam. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon (WiDr) secara *in vitro*.

Metode penelitian: Metode penelitian yang digunakan adalah kuantitatif eksperimental laboratorik. Rangkaian penelitian meliputi uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) pada sel WiDr dengan menggunakan metode MTT assay untuk menentukan viabilitas sel dan uji migrasi menggunakan *scratch wound healing assay* untuk menentukan presentase penutupan sel (persentase migrasi).

Hasil penelitian: Uji sitotoksik ektrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) pada sel kanker kolon (WiDr) memberikan nilai IC_{50} sebesar 129.5 µg/ml yang termasuk sitotoksik moderat. Sedangkan, pada uji migrasi sel dalam waktu 36 jam dengan menggunakan metode *Scracth wound healing assay* memperoleh hasil daya hambat migrasi terbesar yaitu ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) pada dosis 3/2 IC_{50} atau sebesar 194.25 µg/ml

Kesimpulan: Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulate)* berpengaruh dalam menghambat migrasi sel kanker kolon (WiDr) sehingga dapat digunakan sebagai kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker.

Kata kunci : *Citrus reticulata*, WiDr, migrasi.

LATAR BELAKANG

Kanker adalah salah satu penyebab kematian di seluruh dunia. Lebih dari separuh dari semua kanker (56,8%) dan kematian akibat kanker (64,9%) pada tahun 2012 terjadi di wilayah yang kurang berkembang di dunia, dan akan meningkat sebesar 19,3 juta kasus kanker baru pertahun pada tahun 2025. Kanker yang sering terjadi di seluruh dunia adalah kanker paru-paru (1,8 juta, 13,0% dari total), payudara (1,7 juta, 11,9%), dan kolorektum (1,4 juta, 9,7%) (WHO, 2013). Di Indonesia, kanker kolorektum menempati urutan nomer 3 dengan insiden kanker kolorektum di Indonesia adalah 12,8 per 100.000 penduduk usia dewasa, dan mortalitas 9,5% dari seluruh kasus kanker (IARC, 2012). Sebagian besar penderita kanker kolorektum di Indonesia datang ke rumah sakit dalam stadium lanjut karena tidak jelasnya gejala awal dan tidak mengetahui atau menggagap penting gejala dini yang terjadi, dimana hal ini berperan dalam peningkatan angka kejadian kanker di Indonesia. (Kemenkes RI, 2017)

Berbagai terapi telah digunakan untuk mengobati kanker kolon, seperti kemoterapi, pengobatan, dan pembedahan. Akan tetapi tingginya biaya yang dikeluarkan dan efek samping yang ditimbulkan dari terapi kanker memicu kita untuk menemukan suatu terobosan baru untuk menekan angka peningkatan kanker kolon sedini mungkin, salah satunya melalui sumber daya alam. Indonesia kaya akan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, salah satunya adalah *Citrus reticulata* yang kita kenal sebagai jeruk Mandarin. Jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk menjaga kesehatan manusia, salah satunya kulit jeruk Mandarin yang mengandung *tangeretin* dan *nobiletin*, senyawa flavonoid utama dalam kulit jeruk Mandarin yang memiliki efek antikanker

yang jarang ditemukan pada tanaman lain. (Morley, *et al*, 2007).

Tangeretin dan nobiletin dalam kulit jeruk Mandarin dapat meningkatkan regulasi ekspresi P53. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa tangeretin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia HL-60 (Hirano *et al.,*1995) Penelitian in vivo ekstrak ethanol kulit jeruk Mandarin dilaporkan dapat menekan ekspresi N-Ras dan c-Myc pada karsinogenesis hepar tikus (Nugroho et al., 2008 Putri et al., 2008). Penelitian in vitro menunjukkan bahwa senyawa tangeretin dalam kulit jeruk Mandarin mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7, sel kanker payudara MDA-MB-435, dan sel kanker kolon HT-29 yang diamati selama 4 hari perlakuan dan fase G1 arrest setelah pengamatan pada jam ke-24, 48, dan 72. (Morley et al., 2007).

Selama ini belum pernah diteliti mengenai pengaruh ekstrak kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon. Pada penelitian ini akan diteliti mengenai pengaruh ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro menggunakan metode *scratch wound healing assay*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif eksperimental laboratorik yang akan dilakukan secara in vitro. Populasi diambil dari kultur sel kanker kolon WiDr yang didapatkan dari *Cancer Chemopreventive Research* Universitas Gadjah Mada, Yogykarta. Penanaman sel kanker kolon WiDr menggunakan media tanam RPMI yang telah terstandarisasi. Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) adalah ekstrak kental kulit jeruk Mandarin yang diperoleh dari sisa ekstrak yang telah dipakai dan disimpan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Sampel yang akan digunakan pada uji sitotoksik terdiri atas sembilan kelompok perlakuan. Kelompok 1 adalah sel WiDr sebagai kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun dan hanya dibiarkan tumbuh di media tumbuhnya. Kelompok 2 adalah sel WiDr sebagai kontrol positif yang diberi obat doxorubicin sebagai obat standar kanker dengan dosis 7,5 μg/ml, 15 μg/ml, dan 20 μg/ml. Kelompok 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 adalah sel WiDr yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml, 120 μg/ml, dan 240 μg/ml. Kelompok kontrol positif dan negatif dilakukan tiga kali pengulangan setiap kelompok perlakuan. Sedangkan, kelompok sel yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin dilakukan lima kali pengulangan setiap kelompok perlakuan.

Sampel yang akan digunakan pada uji migrasi terdiri atas delapan kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan kultur sel kanker sebanyak tiga kali. Kelompok 1 adalah sel kanker sebagai kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun dan hanya dibiarkan tumbuh di media tumbuhnya. Kelompok 2 adalah sel kanker sebagai kontrol positif yang diberi obat doxorubicin sebagai obat standar kanker dengan dosis IC50. Kelompok 3, 4, 5, 6, 7, 8 adalah sel kanker yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC_{50}, IC_{50}, dan 3/2 IC_{50}.

Penelitian ini dilakukan secara 2 tahap yaitu uji sitotoksik dengan metode MTT assay dan uji migrasi dengan metode *scratch wound healing assay*. Uji sitotoksik dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Uji sitotoksik menggunakan metode MTT assay merupakan evaluasi yang telah terstandarisasi untuk mengetahui potensi sitotoksik dari ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin terhadap sel WiDr yang dilakukan selama sehari semalam,

kemudian hasilnya dibaca menggunakan ELISA reader.

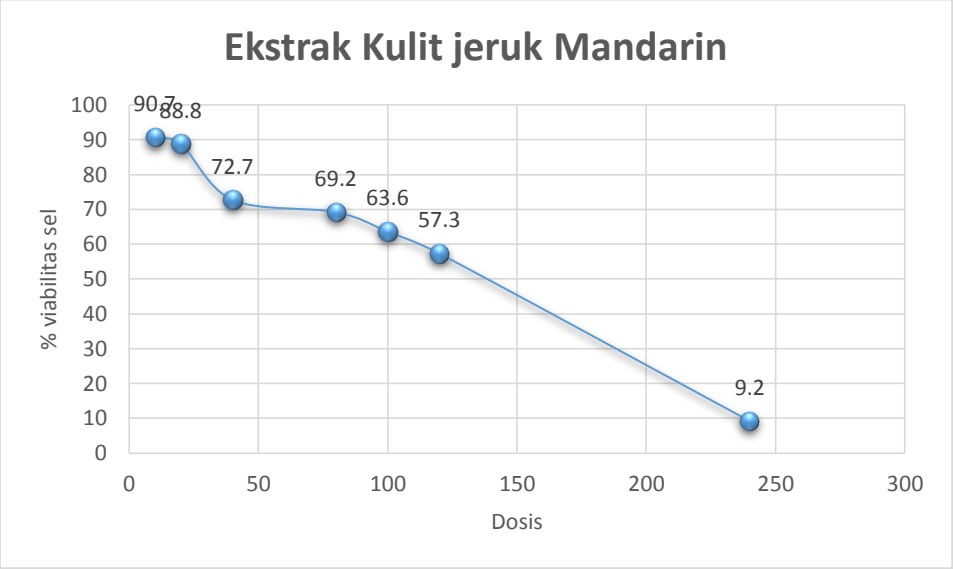
Teknik analisis data yang digunakan dari uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin, dihitung persen viabilitas sel. Data persen viabilitas sel dihitung IC_{50}nya menggunakan persamaan regresi linier menggunakan SPSS 15.

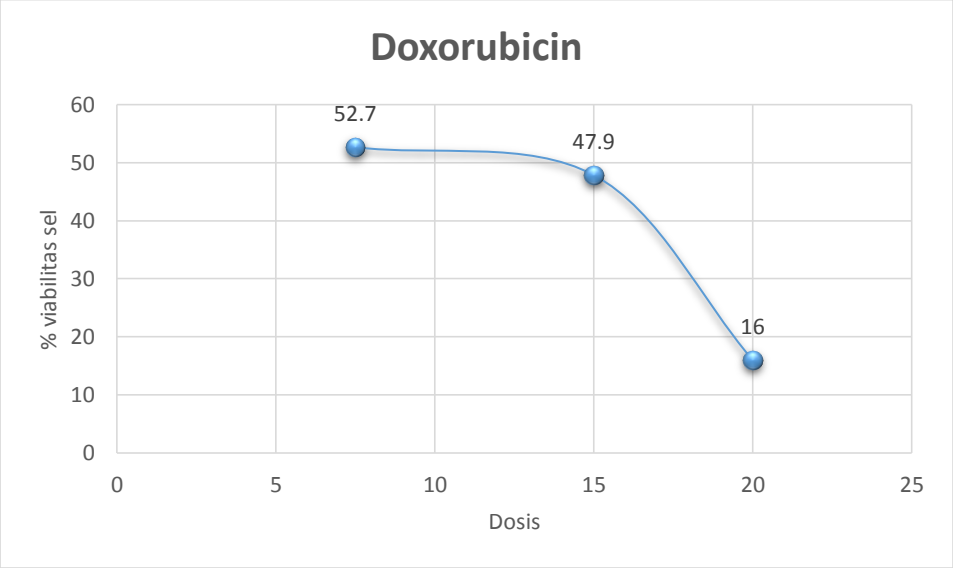
Sedangkan, uji migrasi menggunakan metode *scratch wound healing assay* dengan membuat goresan pada sel monolayer dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Alat yang akan digunakan untuk mengamati yaitu mikroskop *inverted* yang biasa dipakai untuk mengamati migrasi sel kanker maupun sel normal, dan waktu yang diperlukan uji migrasi adalah setiap 12 jam. Alat ukur yang akan digunakan pada uji migrasi adalah *software ImageJ* yang telah banyak digunakan sebagai *software* penghitung migrasi sel. Kemudian, data yang diperoleh dihitung persentase penutupan sel (% migrasi). Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 15 dengan uji ANOVA satu jalan (*One way ANOVA*), karena pada penelitian ini sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin terhadap viabilitas sel WiDr dilakukan menggunakan metode MTT. Prinsip metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) menjadi kristal formazan warna ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase akibat aktivitas metabolik seluler oleh NAD(P)H-dependent enzim seluler oksireduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria (Berridge *et al*,2005). Reaksi antara MTT dengan enzim reduktase suksinat tetrazolium merupakan reaksi enzimatis yang berlangsung terus-menerus sehingga diperlukan larutan *stopper* (SDS 10% dalam HCL 0,01 N)

untuk menghentikan reaksi tersebut. Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader dan dihitung viabilitas sel. Hasil dari perhitungan tersebut disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel (CCRC, 2013).





Berdasarkan grafik tersebut, aktivitas ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin menunjukkan pola *dosedependent*, yaitu viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak. Data persen viabilitas sel dihitung IC50nya menggunakan persamaan regresi linier menggunakan software SPSS 15 pada 7 titik konsentrasi yaitu dosis 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL,

120 μg/mL, dan 240 μg/mL sehingga didapatkan persamaan linear y= a+bx. Koefisien y pada persamaan linier menunjukkan IC50, sedangkan koefisien x menunjukkan konsentrasi ekstrak yang akan dicari nilainya, dimana x yang diperoleh merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat menghambat viabilitas sel sebesar 50%. Sehingga, untuk mencari nilai IC_{50}, dimasukkan nilai y sebesar 50, sehingga persamaan menjadi 50 = 77.892-2.755x.

Berdasarkan persamaan linear tersebut didapatkan nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin sebesar 129.5 μg/ml yang termasuk sitotoksik moderat. Sitotoksisitas dikelompokkan menjadi tiga yaitu (1) Sitotoksik potensial jika IC_{50}< 100 μg/ml, (2) sitotoksik moderat jika 100 μg/ml<IC_{50}<1000μg/ml, dan (3) tidak toksik jika IC_{50}> 1000 μg/ml. Kelompok senyawa dengan sitotoksik potensial dapat digunakan sebagai agen antikanker (Tussanti, 2014). *National Cancer Institute* (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong anti kanker jika IC_{50}<20 μg/ml. Sedangkan ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang tergolong senyawa dengan sitotoksik moderat dapat digunakan sebagai kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Prayong, 2008).

Nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit jeruk mandarin juga dibandingkan dengan nilai IC_{50} doxorubicin pada sel WiDr yaitu 10.124 μg/ml. Sesuai *National Cancer Institute* (NCI), IC_{50} doxorubicin termasuk sitotoksik potensial atau senyawa antikanker karena IC_{50}<20 μg/ml. Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol kulit jeruk mandarin mempunyai aktivitas sitotoksik lebih rendah daripada doxorubicin, namun tergolong senyawa dengan sitotoksik moderat.

Uji migrasi dilakukan menggunakan metode *scratch wound healing assay* yang meruoakan metode yang mudah, murah, dan dikembangkan dengan baik untuk mengukur migrasi sel secara in vitro

(Liang, *et al*., 2007). Prinsip dasar dalam metode ini dimulai dengan membuat goresan pada sel monolayer menggunakan yellow tip steril sehingga terbentuk celah dengan ukuran tertentu. Dosis ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang digunakan adalah 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC50, IC_{50}, dan 3/2 IC_{50}. Sedangkan sebagai kontrol sel negatif adalah sel WiDr tanpa perlakuan, dan kontrol positif adalah doxorubicin dengan dosis IC_{50}.

Penentuan kemampuan migrasi sel dilakukan dengan mengamati sel dengan mengambil gambar di bawah mikroskop *inverted* secara berkala dengan interval waktu 12 jam yaitu pada jam ke-0, 12, 24, dan 36. Gambar migrasi yang didapatkan kemudian diolah menggunakan software *ImageJ* yang telah banyak digunakan sebagai *software* penghitung migrasi sel. Hasil yang didapatkan berupa luas area migrasi tiap perlakuan yang kemudian dihitung persen penutupan sel atau persentase migrasi dengan hasil sebagai berikut

Tabel 1. Persentase penutupan sel WiDr (%migrasi)

Jam ke	Kontrol	Doxorubicin	1/8 IC50	1/4 IC50	1/3 IC50	1/2 IC50	IC50	3/2 IC50
12	11.6	8.4	13.9	15	6.7	7	6	13
24	19.9	12.7	22.4	29.8	16	13.9	7.7	26
36	28.8	21	36.1	45.3	25.9	17.9	36.1	30

Tabel 2. Interval presentase penutupan sel WiDr

Interval antar jam	Kontrol	Doxorubicin	1/8 IC50	1/4 IC50	1/3 IC50	1/2 IC50	IC50	3/2 IC50
12-24	8.3	4.3	8.5	14.8	9.3	6.9	1.7	13
24-36	8.9	8.3	13.7	15.5	9.9	4	28.4	4

Berdasarkan tabel 3, daya hambat migrasi terbesar dapat dilihat pada ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) pada dosis 3/2 IC_{50} atau 194.25 μg/ml dengan interval presentase sel yang mengalami rentang terbesar yaitu dari 13% menurun menjadi 4%. Daya hambat migrasi ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis 3/2 IC_{50} lebih besar jika dibandingkan kontrol dengan interval presentase penutupan pada jam ke 12-24 sebesar 8.3% dan jam ke 24-36 sebesar 8.9% dan doxorubicin sebagai kontrol positif dengan interval presentase penutupan pada jam ke 12-24 sebesar 4.3% naik menjadi 8.3%.

Interval presentase penutupan sel WiDr sangat bervariasi, ada hasil persentase yang cenderung sama, mengalami penurunan, atau mengalami peningkatan. Hal ini tentunya dipengaruhi oleh berbagai faktor. Berbagai faktor di dalam sel kanker yang meningkatkan migrasi, diantaranya yang disebut *autocrine motility factor*. Sel kanker menjadi infiltratif apabila mempunyai kemampuan untuk menembus ke dalam saluran limfe dan saluran darah. Ini merupakan permulaan dari proses migrasi sel. (Bosman, 1999). *Autocrine motility factor* (AMF) merupakan suatu glikoprotein 60-kD yang dihasilkan oleh human melanoma cells yang menstimulasi migrasi sel. Autotaxin (ATX) merupakan suatu agent autocrine motilitas lainnya yang dapat menyebabkan respon kemotaktik dan kemokinetik pada human melanoma cells. Identifikasi terhadap AMF dan ATX menimbulkan dugaan bahwa stimulasi pergerakan sel tumor terjadi sebagai respon terhadap mekanisme autocrine (Lumongga, 2008).

Faktor di luar sel kanker yaitu faktor lingkungan mikro juga mempengaruhi migrasi sel. Lingkungan mikro salah satunya terdiri atas campuran molekul-molekul matriks ekstraseluler (ECM) yang memegang peranan dalam angiogenesis. Matriks ekstraseluler memiliki struktur yang menunjang

penancapan sel kanker ke jaringan sekitar dan secara homeostasis memediasi komunikasi antar sel. ECM dan membran basal merupakan sumber inhibitor angiogenesis endogen, misalnya endostatin (Bosman, 1999). Sel kanker dapat juga terpapar pada stress lingkungan termasuk pH rendah, reactive oxygen species (ROS), dan mediator inflamasi. Stres tersebut dapat menyebabkan terjadinya seleksi sel-sel kanker yang memiliki kemampuan tetap tumbuh menghadapi tantangan tersebut dan mengalami proses perubahan menjadi fenotip agresif (Kurniawan, 2014). Misalnya hipoksia menstabilkan HIF (*hypoxia inducible factor*, HIF-1) yang merupakan aktivator angiogenik yang merangsang ekspresi gen yang memberi respons terhadap hipoksia (hypoxia responsive genes), misalnya gen yang menyandi enzim glikolitik seperti aldolase-A, enolase, dan LDH-A. Ke dalam kelompok ini juga termasukVEGF (*vascular endothelial growth factors*) yang merupakan faktor pertumbuhan endotel yang mendukung pembentukan pembuluh darah (angiogenesis) yang merupakan proses yang menginisiasi migrasi sel (Kresno, 2011).

Data migrasi sel WiDr yang diberi ekstrak kulit jeruk Mandarin pada beberapa dosis perlakuan dilakukan uji normalitas untuk melihat data tersebut normal atau tidak. Selain itu, data tersebut kurang dari 50 sampel, sehingga uji normalitas yang digunakan yaitu Saphiro Wilk, yang didapatkan nilai p> 0.05 yang berarti data terdistribusi normal. Selanjutnya, data terdistribusi normal maka dianalisis menggunakan uji parametrik yaitu *One way ANOVA* karena pada penelitian ini sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda. Dari hasil uji homogenitas, diketahui nilai signifikansi (p-value) 0.177 yang berarti p> 0.05, sehingga menunjukkan persebaran data homogen. Hasil uji *One*

way ANOVA akan muncul bersamaan dengan uji Homogentitas varian yang diperoleh nilai signifikansi (p-value) 0.011 yang berarti $p<0.05$. Hal ini menunjukkan bahwa keputusan yang diambil adalah menerima H1 yaitu ada perbedaan hasil uji migrasi yang berarti ada pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr.

Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya bahwa terdapat senyawa-senyawa yang dapat menghambat migrasi, beberapa diantaranya dari golongan flavonoid yang memiliki sifat antikanker (Nijveldt, et al., 2001). Kulit jeruk Mandarin mengandung *polyhydroxyl flavonoid* (PHFs) seperti hesperidin, neohesperidin, dan naringin, dan hampir satu-satunya sumber *polymethoxyflavones* (PMFs) dengan kandungan tinggi, terutama diwakili oleh nobiletin, tangeretin, sinesetin, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, dan 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone. (Rawson, et al., 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) merupakan senyawa sitotoksik moderat terhadap sel kanker kolon WiDr yang dapat digunakan sebagai kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker dengan nilai IC_{50} sebesar 129.5 µg/ml.
2. Ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) berpengaruh dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro dengan $p<0.05$ yaitu sebesar 0.011.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan peneliti antara lain

1. Perlu diperhatikan tempat penyimpanan dan jangka waktu

penyimpanan ekstrak kental agar kualitas ekstrak dalam uji sitotoksik dan uji migrasi lebih optimal.

2. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) terhadap ekspresi MMP (Matrix Metaloproteinases) dan aktivitas proteasome pada sel kanker kolon WiDr.

DAFTAR PUSTAKA

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, 127–152.

Bosman FT. (1999). Aspek-aspek fundamental kanker. Dalam : van de Velde CJH, Bosman FT, Wagener DJTh. Onkologi. Edisi 5. Alih bahasa : Yogyakarta : Gajah Mada University Press. 10-14.

CRCC. (2013). Protokol uji sitotoksik metode MTT. Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi UGM.

CRCC. (2015). Pengamatan Migrasi dengan Scratch Wound Healing Assay. Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi UGM.

Hirano, et al. (1995). Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. Br J Cancer:72(6), 1380-1388

International Agency for Research on Cancer (IARC) / WHO. (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence world wide in 2012.

Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2017). Komite Penanggulangan Kanker Nasional. Panduan Penatalaksanaan Kanker Kolorektal.

Kresno SB. Angiogenesis dan metastase. Edisi 2. Jakarta:Badan Penerbit FKUI:2011.hal.221-37

Kurniawan, Puji., Muhtarum Yusuf. (2014). Proses Metastasis Pada Keganasan Kepala Leher. *Jurnal THT*, 37-46.

Liang, C.C., Park, A. Y., Guan J.L. (2007). ‘In vitro assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro[Abstrak]’. *Nat protoc* 2(2);329-33.

Lumongga, d. F. (2008). Invasi Sel Kanker. *USU Repository*.

Morley, P. J. Ferguson, and J. Koropatnick. (2007). “Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and kolon cancer cells,” Cancer Letters vol.251,no.1,pp.168–178.

Nijveldt, R.J., Nood , E.V., Hoorn, D.E.V., Boelen, P.G., Norren, K.V., and Leeuwen, P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.

Article Review. Am J Clin Nutr 2001;74:418–25

Nugroho PA, Putri DA, Darma AP, Riyanto S, Meiyanto E (2008). Penelusuran Mekanisme Penekanan Ekspresi N-Ras Ekstrak Etanolik Kulit Jeruk Keprok (Citrus reticulata) Sebagai Agen Kemopreventif Docking Molekuler pada Protein Target C-SRC dan CYP1A2, Proceeding, Kongres Ilmiah XVI Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia, 184-192. (In Indonesia)

Prayong P., Barusrux S. and Weerapreeyakul N. (2008). Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants, Fitoterapia, 79 (7-8), 598–601.

Rawson, N. E., Ho, C.-T., & Li, S. (2014). Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. Food Science and Human Wellness, 3(3-4), 104–109. doi:10.1016/j.fshw.2014.11.001

Tussanti I. and Johan A., 2014, Sitotoksisitas in vitro ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa*, reinw. ex bl.) terhadap sel kanker payudara T47D, *Jurnal Gizi Indonesia*, 2 (2), 53– 58

World Health Organization. (2013). International Agency Research for Research on Cancer. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. IARC.