

ARTIKEL PENELITIAN

Efek antigenotoksik ekstrak etanolik daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap frekuensi mikronukleus mukosa bukal tikus *Sprague Dawley*

Tyas Prihatiningsih*, Tetiana Haniastuti**, Dewi Agustina***

*Program Studi S2 Ilmu Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

**Departemen Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

***Departemen Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*JI Denta No 1, Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia; e-mail: tyasprihatiningsih@gmail.com

Submisi: 15 Juni 2016; Penerimaan: 19 Oktober 2016; Publikasi online: 28 April 2017

ABSTRAK

Polycyclic aromatic hydrocarbon atau PAH merupakan salah satu kelompok karsinogen terbesar di lingkungan. 7,12-Dimetilbez(α)antracena merupakan senyawa golongan PAH yang bersifat karsinogen genotoksik. Salah satu uji genotoksisitas yang paling sering dilakukan adalah uji mikronukleus. Sirsak merupakan tanaman yang tumbuh baik di Indonesia. Daun sirsak mengandung flavonoid dan acetogenin yang diduga mempunyai potensi kemopreventif dan aktivitas antikanker. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji efek antigenotoksik ekstrak etanolik daun sirsak terhadap frekuensi mikronukleus mukosa bukal tikus galur *Sprague Dawley* yang diinduksi dengan DMBA. Penelitian ini dilakukan pada 24 tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 5 minggu yang dibagi secara acak dalam 6 kelompok. Karsinogenesis dorsum lidah tikus kelompok I – III diinduksi dengan DMBA secara topikal 3 kali dalam seminggu selama 16 minggu, kelompok II dan III selain diinduksi karsinogenesis, juga diberi ekstrak etanolik daun sirsak 100 dan 200 mg/kg BB setiap hari selama 18 minggu dan kelompok IV diberi ekstrak etanolik daun sirsak 200 mg/kg BB, kelompok V diberi DMSO 1% dan kelompok VI tidak diberi perlakuan. Setelah minggu ke-18, swab mukosa bukal dilakukan untuk uji mikronukleus kemudian sampel dicat dengan metode Feulgen-Rossenbeck. Jumlah mikronukleus dihitung di bawah mikroskop cahaya per 500 sel epitel mukosa bukal, lalu data dianalisis menggunakan one way ANOVA diikuti Tukey HSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata frekuensi mikronukleus kelompok II ($13 \pm 0,82$) dan kelompok III ($12 \pm 0,96$) mengalami penurunan secara signifikan ($p < 0,05$) dibanding kelompok I ($24 \pm 1,71$). Disimpulkan bahwa ekstrak etanolik daun sirsak mempunyai efek antigenotoksik yang ditunjukkan dengan penurunan frekuensi mikronukleus sel epitel mukosa bukal tikus.

Kata kunci: DMBA; ekstrak etanol daun sirsak; frekuensi mikronukleus; PAH

ABSTRACT: *The effect of soursop leaves (Annona uricata linn) ethanolic extract on micronucleus frequency of buccal mucosa epithelium of Sprague dawley rats.* Polycyclic aromatic hydrocarbons is one of the largest groups of carcinogen in environment. 7,12-Dimetilbez (α) antracena is a compound of PAH class that has genotoxic carcinogen potency. One of the most frequently applied genotoxicity tests is micronucleus test. Soursop is a plant that can grow well in Indonesia. Its leaves contain flavonoid and acetogenin assumed to have potential chemopreventive and anticancer activities. The aim of this study was to assess the antigenotoxic effect soursop leaves ethanolic extraction the micronucleus frequency of DMBA-induced buccal mucosa of rat. This research was conducted on 24 male Sprague Dawley rats aged 5 weeks and divided into six groups. Carcinogenesis on the lingual dorsum of group I-III were induced by DMBA topically 3 times a week for 16 weeks, group II and III were not only induced by carcinogenesis, but also were given soursop leaves ethanolic extract of 100 and 200 mg/kg body weight for 18 weeks, group IV was given soursop leaves ethanolic extract 200 mg/kg body weight, group V was given DMSO 1% and group VI was given no treatment. After 18th week, buccal mucosa swab for micronucleus test was conducted and stained with Feulgen-Rossenbeck method. The number of micronucleus is calculated under a light microscope, data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD. The result showed that the average of buccal micronucleus frequency of group II (13 ± 0.82) and group III (12 ± 0.96) were decrease significantly ($p < 0,05$) than group I (24 ± 1.71). From the experiment, it is concluded that the soursop leaves ethanolic extract has antigenotoxic effect shown by decreasing of the buccal micronucleus frequency of rat.

Keywords: DMBA; soursop leaves ethanolic extract; micronucleus frequency; PAH

PENDAHULUAN

Berdasarkan *the report on carcinogenic* (RoC), polutan dan bahan-bahan kimia berbahaya di lingkungan sebagian besar mempunyai potensi

genotoksik dan bahkan karsinogenik.¹ Zat genotoksik diketahui mempunyai potensi mutagenik ataupun karsinogenik, khususnya bagi zat-zat yang mampu menyebabkan mutasi genetik dan berkontribusi bagi

perkembangan tumor.² Karsinogen dapat berupa zat genotoksik maupun non-genotoksik. Karsinogen genotoksik dapat menimbulkan kerusakan DNA secara langsung ataupun tidak langsung melalui aktivasi metabolik terlebih dahulu.³

Senyawa golongan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) yang merupakan polutan utama lingkungan merupakan salah satu kelompok karsinogen terbesar di lingkungan.⁴ Senyawa PAH tersebar luas di lingkungan. Residu PAH berada di udara berupa suspensi partikulat dalam polutan udara, sehingga paparan PAH dapat melalui inhalasi. Makanan merupakan sumber utama paparan PAH terhadap populasi pada umumnya.⁵

Salah satu senyawa dari golongan PAH adalah 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA). Senyawa DMBA merupakan suatu karsinogen genotoksik.⁶ Beberapa penelitian menggunakan DMBA dalam menginduksi karsinogenesis rongga mulut hamster.⁷⁻¹¹ Uji genotoksisitas menunjukkan bahwa senyawa DMBA dapat menginduksi poliploidi dan *sister chromatic exchanges*.¹² Salah satu uji genotoksisitas yang paling sering dilakukan adalah uji mikronukleus.¹³

Paparan senyawa genotoksik DMBA selain mengakibatkan DNA *adduct*,¹⁴ juga menyebabkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan.¹¹ Produksi ROS yang berlebihan salah satunya mengakibatkan kerusakan oksidatif struktur dan fungsi DNA.¹⁵ Kerusakan DNA menyebabkan kelainan struktur kromosom disertai kesalahan dalam replikasi DNA. Salah satu contoh kelainan struktur kromosom adalah terbentuknya fragmen asentrik. Ketika fragmen asentrik gagal bergabung dengan inti sel anakan dan tertinggal dalam sitoplasma, maka mengakibatkan timbulnya mikronukleus.¹⁶ Mikronukleus dapat berasal dari fragmen kromosom asentrik, fragmen kromatid asentrik maupun seluruh kromosom yang tertinggal pada saat anafase.¹⁷

Pemeriksaan mikronukleus digunakan sebagai biomonitor kerusakan genomik,¹⁸ sehingga mikronukleus menjadi salah satu biomarker genomik karsinogenesis rongga mulut.¹⁹ Mikronukleus merupakan salah satu indikator kerusakan DNA yang paling sensitif.²⁰ Akumulasi perubahan genetik pada karsinogenesis rongga mulut dapat diamati

pada mukosa bukal dengan metode invasif yang minimal dan mudah.²¹ Sel mukosa bukal merupakan pertahanan pertama pada rute paparan karsinogen melalui pencernaan dan mampu memetabolisme *proximate carcinogen* menjadi produk reaktif.¹⁸

Daun sirsak mempunyai potensi kemopreventif dalam menghambat karsinogenesis. Potensi tersebut diperkirakan berkaitan dengan kandungan *annona acetogenin* pada daun sirsak.²² Pada beberapa penelitian secara terpisah, daun sirsak terbukti mempunyai mekanisme aksi kemopreventif diantaranya aktivitas antioksidan,²³ antiproliferasi,²⁴ menurunkan metastasis dan menginduksi apoptosis pada sel kanker pankreas.²⁵ Beberapa penelitian *in vivo* menunjukkan aktivitas antikanker daun sirsak terhadap papilogenesis kulit mencit,²² displasia payudara tikus,²⁶ tumor prostat tikus²⁷ dan kanker kolon pada tikus.²⁸

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek antigenotoksik ekstrak etanolik daun sirsak terhadap frekuensi mikronukleus mukosa bukal tikus galur *Sprague Dawley* yang diinduksi dengan DMBA.

METODE PENELITIAN

Determinasi tanaman sirsak dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM (No. BF/137/Ident/Det/III/2015) dengan hasil *Annona muricata* L. Ekstraksi daun sirsak dilakukan di LPPT unit II UGM. Daun sirsak yang terkumpul dibersihkan, kemudian diiris kecil-kecil dan dikeringkan dengan suhu 50 °C hingga kadar air kurang dari 10%. Selanjutnya, daun digiling menggunakan mesin penyerbuk. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak dilarutkan terlebih dahulu ke dalam DMSO 1% sebelum diberikan secara *per oral*. Seluruh prosedur penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik FKG UGM Yogyakarta dengan diterbitkannya *ethical clearance* No. 000132/KKEP/FGK-UGM/EC/2015.

Penelitian dilakukan pada 24 tikus *Sprague Dawley* jantan, berusia 5 minggu dengan berat badan 49 – 89 g yang diperoleh dari LPPT unit IV UGM Yogyakarta. Tikus dikelompokkan secara acak ke dalam enam kelompok. Kelompok I – III diinduksi DMBA selama 16 minggu, kelompok II

dan III selain diinduksi karsinogenesis dengan DMBA, juga diberikan ekstrak etanolik daun sirsak 100 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB *per oral* selama 18 minggu, dimulai dari 1 minggu sebelum induksi karsinogenesis dengan DMBA, kelompok IV diberikan ekstrak etanolik daun sirsak 200 mg/kg BB selama 18 minggu, kelompok V diberikan DMSO 1% selama 18 minggu dan kelompok VI tidak diberi perlakuan. Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan kandang selama 1 minggu sebelum perlakuan.

Induksi karsinogenesis dengan senyawa DMBA pada dorsal lidah tikus dilakukan dengan mengoleskan 0,5% DMBA dalam aseton dengan menggunakan kuas lukis nomer empat sebanyak dua kali usapan dari arah posterior ke anterior. Induksi DMBA dilakukan sebanyak tiga kali per minggu selama 16 minggu. Pemberian ekstrak etanolik daun sirsak dosis 100 mg/kg dan 200 mg/kg berat badan dilakukan setiap hari dengan *oral gavage* selama 18 minggu.

Pengambilan sampel sel epitel mukosa bukal dilakukan dengan *swab* mukosa bukal tikus menggunakan *cytobrush*. *Swab* dilakukan dengan menganastesi hewan coba menggunakan ketamin HCl pada minggu ke-18. Sampel yang diperoleh ditempatkan di atas *slide* yang bersih dan diberi 1 tetes larutan NaCl 0,09%, kemudian difiksasi dengan *methanol-acetic acid* (3:1). *Slide* direndam dalam 5 M HCl pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian dicuci dengan akuades selama 10 – 15 menit. *Slide* diwarnai dengan menggunakan metode *Feulgen Rossenbeck* dalam *Schiff's reagent* selama 90 menit dan diwarnai dengan *fastgreen* 1% selama 1 menit.

Frekuensi mikronukleus dihitung dengan menjumlahkan sel yang mempunyai gambaran adanya inti tambahan per lima ratus sel pada masing-masing preparat. Penghitungan frekuensi mikronukleus pada penelitian ini dilakukan per lima ratus sel epitel. Hal ini disebabkan oleh karena jumlah sel epitel mukosa bukal tikus hasil *swab* hanya berkisar antara 500 – 1000 sel. Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan penghitungan mikronukleus per lima ratus sel epitel.²⁹⁻³¹ Penghitungan mikronukleus dilakukan dengan

mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan kamera Optilab® pada perbesaran 400 kali. Data rerata frekuensi mikronukleus dianalisis secara statistik menggunakan *one way ANOVA* dilanjutkan dengan *Tukey HSD* dengan derajat kemaknaan 95%.

HASIL PENELITIAN

Hasil pengamatan mikronukleus sel epitel mukosa bukal yang didapat dari pengecatan *Feulgen Rossenbeck* menunjukkan gambaran inti tambahan berwarna hijau sama seperti inti utamanya, berukuran kurang dari sepertiga inti utamanya, terpisah dengan inti utamanya dan berada dalam sitoplasma yang berwarna hijau cerah (Gambar 1). Hasil tersebut sesuai dengan mikronukleus pada penelitian Shantiningsih (2014).³²



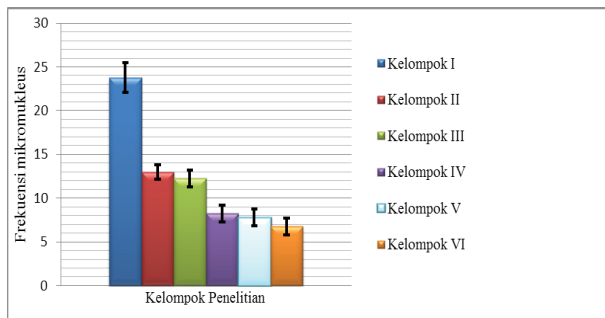
Gambar 1. Sel epitel mukosa bukal tikus yang mengandung mikronukleus (panah merah)

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi frekuensi mikronukleus epitel mukosa bukal tikus

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD
Kelompok Kelompok I	24 ± 1,71
Kelompok Kelompok II	13 ± 0,82
Kelompok Kelompok III	12 ± 0,96
Kelompok Kelompok IV	8 ± 0,96
Kelompok Kelompok V	8 ± 0,96
Kelompok Kelompok VI	7 ± 0,96

Keterangan:

Rerata ± SD frekuensi mikronukleus merupakan angka rasio (jumlah sel yang mengandung mikronukleus/500 sel).



Gambar 2. Grafik frekuensi mikronukleus sel epitel mukosa bukal tikus

Rerata frekuensi mikronukleus sel epitel mukosa bukal tikus menunjukkan penurunan setelah diberi ekstrak etanolik daun sirsak (Tabel 1). Frekuensi mikronukleus paling tinggi terdapat pada kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan mengalami penurunan pada kelompok yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanolik daun sirsak 100 mg/kg berat badan dan 200 mg/kg berat badan (Gambar 2).

Hasil uji *One-way Anova* menunjukkan nilai signifikansi 0,00 ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanolik daun sirsak terhadap frekuensi mikronukleus. Selanjutnya, hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan frekuensi mikronukleus secara bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok I dengan kelompok VI, kelompok I dengan kelompok II dan III, kelompok II dan III dengan kelompok VI, sedangkan kelompok II tidak menunjukkan perbedaan frekuensi mikronukleus secara bermakna dengan kelompok III. Perbedaan tidak bermakna juga terjadi antara kelompok IV dengan kelompok V dan VI.

PEMBAHASAN

Induksi DMBA pada hasil penelitian ini mengakibatkan timbulnya mikronukleus. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Panjamurthy dkk.³³ yang menunjukkan bahwa senyawa DMBA dapat menginduksi terbentuknya mikronukleus pada sumsum tulang. Mekanisme timbulnya mikronukleus akibat induksi DMBA kemungkinan dimulai dari aktivasi metabolik DMBA oleh enzim sitokrom P450 (CYP) yang menghasilkan DMBA-

3-4-dihidrodiol-1-2-epoksida (DMBAE). Diol epoksida DMBA merupakan *ultimate carcinogen* yang mampu berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik basa purin DNA sehingga terbentuk DNA *adduct*.¹⁴ Selain itu, *chemical intermediate* yang dihasilkan pada saat induksi DMBA memperantarai timbulnya kerusakan untai DNA, oksidasi dan deaminasi asam nukleat.³⁴ Kerusakan-kerusakan yang terjadi pada DNA dapat mengakibatkan kelainan kromosom seperti terjadinya fragmen kromatid, selanjutnya ketika fragmen kromatid gagal bergabung dengan inti sel anaknya dan tertinggal dalam sitoplasma maka akan menimbulkan mikronukleus.¹⁶

Perbedaan bermakna frekuensi mikronukleus terlihat pada kelompok tikus yang diinduksi DMBA dengan kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanolik daun sirsak 100 dan 200 mg/kg BB. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun sirsak 100 dan 200 mg/kg BB dapat menurunkan frekuensi mikronukleus pada tikus yang diinduksi DMBA. Mekanisme penurunan frekuensi mikronukleus oleh ekstrak etanolik daun sirsak diduga berkaitan dengan peran kandungan fitokimia dalam ekstrak etanolik daun sirsak. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun sirsak^{26,35} mampu menghambat secara langsung enzim prooksidan seperti *xanthine oksidase* yang dapat menimbulkan ROS³⁶ dan dapat menginduksi enzim protektif yang berperan dalam menginaktifkan elektrofil dan ROS serta dapat menghambat aktivitas isoenzim p450 sehingga dapat mencegah aktivasi metabolik DMBA.³⁷ Mekanisme penghambatan aktivasi metabolik DMBA dengan menghambat aktivitas isoenzim p450 oleh ekstrak etanolik daun sirsak mengindikasikan bahwa ekstrak etanolik daun sirsak merupakan *blocking agent*.³⁸ Selain itu, ekstrak etanolik daun sirsak merupakan antoksidan yang poten secara *in vitro* dan berpotensi memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif melalui aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas. *Reactive oxygen species* merupakan radikal bebas yang meliputi anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH), nitrit oksida (NO),²³ radikal lipid peroksil dan hidrogen peroksida. Terbentuknya ROS merupakan tahap utama inisiasi dan promosi tumor dan mempunyai

peran penting dalam menimbulkan kerusakan DNA dan sinyal mutagenik.³⁶

Kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanolik daun sirsak 100 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan frekuensi mikronukleus secara bermakna ($p>0,05$) dengan kelompok tikus yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanolik daun sirsak 200 mg/kg BB. Hal tersebut diduga karena peningkatan dosis ekstrak menjadi 200 mg/kg BB belum mencukupi untuk menimbulkan efek menurunkan kerusakan DNA yang mengakibatkan terbentuknya mikronukleus, sehingga dapat diasumsikan bahwa diperlukan dosis ekstrak yang lebih tinggi untuk dapat menurunkan frekuensi mikronukleus dari dosis 100 mg/kg BB. Pemilihan dosis ekstrak dilakukan dengan mempertimbangkan dosis LD_{50} ekstrak akuades daun sirsak yaitu 5 g/kg BB.³⁹

Kelompok tikus yang diberi ekstrak etanolik daun sirsak 200 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan frekuensi mikronukleus secara bermakna dibanding dengan kelompok kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik daun sirsak 200 mg/kg BB bersifat *non* toksik terhadap gen atau antigenotoksik sehingga tidak menstimulasi peningkatan frekuensi mikronukleus. Hal tersebut disebabkan oleh karena kandungan fitokimia yang terdapat pada ekstrak bersifat antioksidan²³ dan sebagai *blocking agent* yang dapat mencegah timbulnya mikronukleus.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun sirsak mempunyai efek antigenotoksik terhadap terbentuknya mikronukleus sel epitel mukosa bukal tikus galur *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA. Kandungan fitokimia aktif daun sirsak diduga bersifat antioksidan dan sebagai *blocking agent* sehingga dapat mencegah terbentuknya mikronukleus.

DAFTAR PUSTAKA

1. US. Department of health and human services. Report on Carcinogens, 12th Ed. Public Health Service, National Toxicology Program. 2011.

2. Sen DJ, Shisio CJ, Lahiri A. Three musketeers of genotoxicity: carcinogen, mutagen and teratogen. *NSHM Journal of Pharmacy and Healthcare Management*. 2011; 2: 13 – 25.
3. King RJB. *Cancer biology*, 2nd Ed. London: Pearson Education; 2000.
4. Tudoran MA, Putz MV. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from in cerebro to in silico ecotoxicity fate, chem. Bull. "Politehnica" Univ, (Timisoara). 2012; 57(71): 50 – 53.
5. IPCS. Environmental health criteria no. 202. selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. international programme on chemical safety. 1998. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>, diunduh 9 September 2014.
6. Okamura M, Unami A, Moto M, Maqumuru M, Ito T, Jin M, Kashida Y, Mitsumori K. The possible mechanism of enhanced carcinogenesis induced by genotoxic carcinogens in rasH2 mice. *Cancer Lett*. 2007; 245(1-2): 321 – 30.
7. Kitakawa D, Cabral LAG, Marques MEA, Salvadori DMF, Ribeiro DA. Medium-term tongue carcinogenesis assays: A comparative study between 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)-induced rat and dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced hamster carcinogenesis. *JEANS*. 2006; 43: 219 – 227.
8. Sun Z, Sood S, Li N, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Chemoprevention of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) - induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 tyrosine kinases. *Oral Oncol*. 2008; 44(7): 652 – 657.
9. Yu T, Wang X, Gong R, Li A, Yang S, Cao Y, Wen Y, Wang C, Yi X. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. *JECRCR*. 2009; 28(64): 1 – 10.
10. Berta GN, Salamone P, Sprio AE, Scipio FD, Marinos LM, Sapin S, Carlotti ME,

- Cavalli R, Carlo FD. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Oral Oncol.* 2010; 46: 42 – 48.
11. Hsu WH, Lee BH, Pan TM. Effects of red mold dioscorea on oral carcinogenesis in dmbs-induced hamster animal model. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49: 1292 – 1297.
 12. Balakrisnan S, Menon VP, Manoharan S, Rajalingan K. Antigenotoxic effect of ferulic acid in 7, 12-dimethyl benz(α)anthracene induced genotoxicity. *Afr. J. Traditional.* 2008; 5(1): 32 – 38.
 13. Bolt HM, Stewart JD, Hengstler JG. A comprehensive review about micronuclei: mechanisms of formation and practical aspects in genotoxicity testing. *Arch Toxicol.* 2011; 85: 861 – 862.
 14. Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbon results from formation of stable DNA Adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis.* 1999; 20(10): 1885 – 1891.
 15. Ray G, Husain SA. Oxidant, antioxidant and carcinogenesis. *IJEB.* 2002; 40: 1213 – 1232.
 16. Igarashi M, Nagata M, Itoh S, Yamoto T, Tsuda S. Relationship between DNA damage and micronucleus in mouse liver. *J. Toxicol. Sci.* 2010; 35(6): 881 – 889.
 17. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011; 26(1): 125 – 132.
 18. Holland N, Bolognesi C, Bonassi S, Zeiger E, Fenech M, Knasmueller S. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mut. Res.* 2008; 659(1-2): 93 – 108.
 19. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer: Riview Article. *Journal of Oncology.* 2011. 1 – 10.
 20. Żelazna K, Rudnicka K, Tejs S. In vitro micronucleus test assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Biotechnology.* 2011; 7(2): 70 – 80.
 21. Harsvardhan SJ, Alka DK, Mohan KKP. Micronucleus as potential biomarker of oral carcinogenesis. *IJDA.* 2010; 2(2): 197 – 202.
 22. Hamizah S, Roslida AH, Fezah O, Tan KL, Tor YS, Tan CI. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L. leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. *APJP.* 2012; 13: 2533 – 2539.
 23. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. In vitro antioxidant studies in leaves of annona species. *Indian J. Exp Biol.* 2007; 45(5): 480 – 485.
 24. Moghadamtousi ZS, Karimian H, Rouhollahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, Kadir HA. *Annona muricata* leaves induce G₁ cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2014; 156: 277 – 289.
 25. Torres MP, Rachagani S, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, Johansson SJ, Singh PK, Ganti AK, Batra SK. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. *Cancer Lett.* 2012; 323(1): 29 – 40.
 26. Minari JB, Okeke U. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *The Egypt J of Med. Hum Genet.* 2014; 15(4): 327 – 334.
 27. Asare GA, Afriye D, Ngala RA, Abutiati H, Doku D, Mahmood SA, Rahman H. Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cells, and

- some target genes. *Integr Cancer Ther.* 2015; 14(1): 65 – 74.
28. Moghadamtousi ZS, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int. J Mol Sci.* 2015; 16: 15625 – 15658.
 29. Shantiningsih RR. Patch gingiva mucoadesive β -carotene sebagai pencegah efek samping paparan radiasi radiografi panoramik (kajian in vivo pada kelinci galur New Zealand. Disertasi. Yogyakarta Universitas: Gadjah Mada. 2014.
 30. Dindgire SL, Gosavi S, Kurmawat RM, Ganvir S, Hazarey V. Comparative study of exfoliated oral mucosal cell micronucleus frequency in potentially malignant and malignant lesions. *IJOMP.* 2012; 3(2): 15 – 20.
 31. Buajeeb W, Kraivaphan P, Amornchat C, Suthamajaya K. Reduction of micronuclei in oral lichen planus supplemented with beta-carotene. *JOS.* 2008; 50(4): 461 – 467.
 32. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutant Res.* 1992; 271(1): 69 – 77.
 33. Panjamurthy K, Manoharan S, Balakrisnan S, Suresh K, Nirmal MR, Senthil N, Alias M. Protective effect of withaferin-a on micronucleus frequency and detoxication agents during experimental oral carcinogenesis. *J. Trad. CAM.* 2009; 6(1): 1 – 8.
 34. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Josh V. Nitric Oxide and Cancer: A Review. *World Journ. of Surg. Oncol.* 2013; 11: 118.
 35. Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, Moukette BM, Boyoum FF, Ngogang JY, Saxena AK. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC.* 2014. 516.
 36. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotech.* 2013; 3: 439 – 459.
 37. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev.* 2011; 5(9): 1 – 12.
 38. Shah S.Kaur M. Biomarkers and chemopreventives in oral carcinogenesis and its prevention. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 2014; 18(1): 114 – 121.
 39. Arthur FKN, Woode E, Larbie C, Terlabi EO. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn) aqueous extract in animals. *Euro. J.Exp. Bio.* 2011; 1(4): 115 – 124.