

Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica granatum* Linn.) terhadap Peningkatan Apoptosis Sel Kanker Lidah Manusia Sp-C1 *In Vitro*

Machmud Kholifa
Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

Correspondence to : drg. Machmud Kholifa
Prodi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta
Email : machmudkholifa@yahoo.com

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is one of the most common malignancy in the oral cavity. Currently, cancer treatment using surgery, radiotherapy, chemotherapy and combination. New strategy for cancer therapy is by inducing apoptosis using herbal medicine. Polyphenol is one of a potential anticancer agent that can induce apoptosis. Pomegranate is one of a potential herbal medicine because of its polyphenol enzyme content. The aim of study was to investigate to relation between pomegranate ethanol extract and apoptosis of oral tongue squamous cell carcinoma cell line (SP-C1). The true experimental method was conducted in the present study. Oral tongue squamous cell carcinoma cell line (SP-C1) was treated with three concentration under and upper IC50 and upper of pomegranate ethanol extract, including 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250µg/ml. In apoptosis test, cell stained with fluorochrome ethidium bromide and acridine orange after 24 hours incubation. Fluorescence microscope was use for counting the cell. Viable cell would be stained green and apoptotic cell would be stained yellow. Data was analyzed by Saphiro-Wilk test and Levene test to determine normality and homogeneity of data. If data distribution was normal and homogen, analyze were continue by Parametric test: Pearson correlation, linier regression and One Way ANOVA. The result showed that there was a strong positive correlation between concentration of pomegranate ethanol extract and apoptotic cell ($r = 0,984, p < 0,05$). Pomegranate concentration was a predictor of apoptosis induction 98,6 %. One Way ANOVA test revealed there were a statistically significant difference between each group treated with different concentration ($p < 0,05$). In conclusion, pomegranate ethanol extract treatment induced apoptosis of oral tongue squamous cell carcinoma and the increases of pomegranate ethanol extract concentration followed by the increase of apoptosis induction.

Keyword : oral tongue squamous cell carcinoma, pomegranate ethanol extract, apoptosis

Pendahuluan

Buah delima (*Punica granatum*, Linn.) mengandung fitokimia dan tinggi kandungan zat antioksidan yang didalamnya terdapat polifenol, tanin, dan anthocyanins. Khususnya pada polifenol terdapat 60% komponen *flavonoid* yang dapat menghambat sel kanker dengan menginduksi apoptosis. *Flavonoid* terutama terkandung di dalam biji buah delima yang memiliki khasiat terapeutik antara lain anti bakteri, anti virus, antioksidan, anti tumor, efek ekstrogenik, efektif dalam mengurangi faktor risiko penyakit jantung, termasuk LDL oksidasi, memulihkan pengerasan pada dinding arteri (aterosklerosis), mengurangi tekanan darah sistolik dengan menghambat serum angiotensi-converting enzyme (Aviram, 2001). Pada perawatan kanker, flavonoid dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan sel tumor pada

kanker payudara, kanker prostat, kanker kulit, kanker usus dan paru (Zhang, 2007).

Karsinoma sel skuamosa lidah termasuk kanker rongga mulut pada sel skuamosa yang berasal dari mukosa non – keratinasi lidah (Barasch *et al.*, 1998). Karsinoma lidah biasanya berupa ulserasi dengan ukuran yang kecil berwarna abu-abu, merah muda sampai merah. Karsinoma sel skuamosa secara klinis umumnya merupakan perkembangan dari lesi premaligna, yang tahap awalnya dapat berupa *patch* putih (*leukoplakia*), *patch* merah (*erythroplakia*), maupun gabungan keduanya, yaitu lesi merah dan lesi putih (*erythroleukoplakia*) (Neville & Day, 2002). Kurang lebih 60% dari lesi tersebut terdapat pada 2/3 anterior lidah, umumnya dijumpai pada permukaan ventral dan bagian lateral lidah, karena kedua permukaan tersebut dilapisi mukosa non keratinasi yang lebih tipis

sehingga kemampuan pertahanan terhadap karsinogen lebih kecil (Neville & Day, 2002). Kanker pada anterior lidah disebut juga tumor primer, yang merupakan asal mula penyebaran sel.

Karsinoma pada dorsum lidah jarang terjadi dan biasanya timbul karena adanya abnormalitas mukosa yang kronis. Tidak seperti karsinoma pada bagian anterior, karsinoma pada dorsum lidah biasanya ukurannya lebih besar ketika di diagnosis, karena tidak diketahui ciri-ciri dan gejalanya sejak awal, sehingga lebih menimbulkan sakit, hilang rasa, perubahan suara dan kesulitan menelan, karena tidak terdeteksi sejak awal, sehingga pasien dengan karsinoma pada dorsum lidah telah metastase ke limfonodi pada leher (Lynch *et al.*, 1994).

Karakteristik karsinoma sel skuamosa lidah adalah bersifat invasif, mengalami metastasis, memiliki mekanisme angiogenesis, memiliki kemampuan replikasi tidak terbatas, mampu menghindari proses apoptosis, memiliki sinyal pertumbuhan yang mandiri dan tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan (Hanahan & Weinberg, 2000). Karakteristik biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia *SP-C1* antara lain mempunyai pertumbuhan sel yang cepat, invasi dan metastasis regional yang tinggi ke limfonodi servikal serta sering menyebabkan rekurensi lokal maupun jauh, walaupun telah dilakukan pembedahan radikal. Hal tersebut akibat terjadi mikro- invasi atau metastasis sel dari lokasi primer (Supriatno, 2008). Karsinoma sel skuamosa rongga mulut bersifat lebih agresif dibanding karsinoma sel skuamosa kepala dan leher (Ye *et al.*, 2008). Sifat agresif karsinoma sel skuamosa rongga mulut berhubungan dengan beberapa faktor seperti lokasi anatomis dari tumor, tingkat keterlibatan jaringan sekitar, ukuran tumor, kondisi metastasis saat diagnosis dan derajat histologis (Silveira *et al.*, 2007).

Insidensi terjadinya kanker lidah pada usia tua lebih besar dibanding pada usia muda. Insidensi semakin meningkat dengan bertambahnya usia dan kebanyakan terjadi pada usia 50 tahun keatas (Wood & Sawyer, 1997) dan jarang terjadi pada usia 40 kebawah (Chiang dkk., 2005), beberapa kasus dilaporkan terjadi pada usia muda (Koseoglu dkk., 2005). Kanker lidah pada ras negroid mempunyai insidensi yang lebih besar dibanding ras kaukasoid dan insidensi pada laki-laki 2,6 kali lebih besar dibanding pada perempuan (Silverman, 2001). Di Amerika

Serikat dilaporkan sekitar 50% penderita karsinoma sel skuamosa rongga mulut memiliki angka harapan hidup sekitar 5 tahun (Silverman, 2001).

Etiologi karsinoma pada lidahbelum jelas, dapat dikaitkan dengan syphilis, sepsis, alkohol dan tembakau, defisiensi diet sehari-hari (antara lain zat besi), trauma lokal, bahan adiktif makanan, infeksi *Candida albicans* serta atipisme sitologik dan mutagenesis sel mukosa. (Lynch *et al.*, 1994). Radiasi sinar matahari, radiasi ion (Bsoul *et al.*, 2005), material prostetik yang tidak kompatibel (Sakuma dkk., 2006), faktor genetik dan infeksi virus oncogenik (Adeyemi dkk., 2008), misalnya *Human Papilloma Virus (HPV)* (Silava *et al.*, 2008).

Proses karsinogenesis dan perkembangan kanker umumnya terjadi akibat adanya mutasi gen. Gen yang memfasilitasi proses karsinogenesis dan perkembangan kanker disebut *oncogene* (*Bel-2, c-myc, fos, jun, MDM2* dan *ras*) dan yang menghambat proses karsinogenesis tersebut disebut *supressor genes* (*Bax* dan *p53*). Apabila terjadi kerusakan DNA, terjadi mutasi gen *p53* yang menyebabkan *p53* kehilangan fungsinya sebagai yang menginduksi apoptosis. Selain itu juga terjadi penurunan ekspresi *Bax* yang berperan dalam induksi apoptosis (Boik, 2001). Pada pasien dengan karsinoma sel skuamosa lidah hampir 50% terdeteksi mutasi pada *p53* dan tidak dipengaruhi oleh ukuran tumor, keterlibatan limfonodi, derajat histologi, jenis kelamin, maupun riwayat keluarga (Sielgemann, 2005). Kejadian resistensi terhadap apoptosis umumnya terjadi karena hilangnya fungsi *p53* sebagai *tumor suppressor gene* (Hanahan & Einberg, 2000).

Metode

Penelitian ini bersifat eksperimental murni laboratorik. Variabel pengaruh : konsentrasi ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum* Linn), 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 dan 250 µg/ml, variabel terpengaruh : peningkatan apoptosis pada karsinoma sel skuamosa lidah manusia (biakan sel SP-C1). Variabel terkendali : volume ekstrak etanol buah delima, jenis biakan sel yang digunakan, yaitu *Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma (Supri's Clone 1/ SP-C1)* setelah *passage cell* ke 5 untuk menstabilkan kondisi sel, jumlah sel yang digunakan, yaitu $2,5 \times 10^5$ (uji apoptosis) dan 5×10^5 / well (uji invasi sel kanker), waktu

inkubasi selama 48 jam, kondisi inkubasi (kelembaban udara 95%, 5% CO₂ dan suhu 37°C).

Metode uji apoptosis yang digunakan adalah dengan pewarnaan *Ehtidium bromide* dan *acridine orange*. Sel yang mengalami apoptosis akan tercat berwarna kuning dan sel yang sehat akan tercat berwarna hijau dengan alat pengamatan *microscope fluorescence*. Obyek pada penelitian ini adalah biakan karsinoma sel skuamosa lidah manusia *Supri's Clone 1 (SP - C1)* yang mengalami apoptosis (tercat berwarna kuning dengan pewarnaan *Ehtidium bromide* dan *acridine orange*). Teknik pengambilan sampel : banyaknya replikasi dalam eksperimen dihitung dengan rumus sebagai berikut (Steel dan Torie, *sit.* Harmono 2003) : $(t-1)(r-1) \geq 20$ (keterangan : t = jumlah perlakuan dalam penelitian ini adalah 7 perlakuan, yaitu dengan ekstrak etanol 0µg /ml, 25µg /ml, 50µg /ml, 75µg /ml, 100µg /ml, 150µg /ml, 200µg/ml, dan 250 µg /ml. r=jumlah ulangan dalam penelitian ini. Maka banyaknya replikasi dalam eksperimen adalah $(7-1)(r-1) \geq 20$, $6r \geq 26r \geq 4$. Jadi jumlah ulangan dalam penelitian ini sebanyak 4 ulangan. Maka jumlah sample yang diperlukan adalah : jumlah sampel= ulangan x perlakuan = 4x7=28 cawan petri. Jadi 28 cawan petri x 1 ml sel SP-C1 = 28 ml sel SP-C1. Jadi subyek dalam penelitian ini 28 ml sel SP-C1 yang diperlakukan dalam 28 cawan petri dengan masing-masing cawan petri berisi 1 ml sel SP-C1.

Bahan Penelitian adalah ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum l*), biakan sel SP-C1, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640(Biowest), Bovine Serum Albumine (SBA) 0,2%, Dimethylsulphoxide (DMSO)(Nacalai, Japan, Mill – Q (Lab. Riset), Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Moregate BioTech, Australia), Penisilin-Streptomisin 3% (Invitrogen, CA, USA), Fungizon 1% (Hyclone, Utah USA), Phosphat Buffer Saline (PBS) (Lab. Riset), *Ehtidium bromide* (Sigma-Aldrich Canada, Ltd), *Acridine orange* (Sigma-Aldrich Canada, Ltd), 0,4% Tryphan blue, 4,5 -dimethylthiazol-2-yl - 2,5 -di-phenyl-tetrazoliumbromide (MTT), Alkohol 70% (General Lab.), *Blue tip* (Eppendorf, Jerman), *Yellow tip* (Eppendorf, Jerman), EDTA (Tritriplex) (Gibco, Invitrogen, USA). Alat penelitian berupa microplate 24 well (uji apoptosis) (Iwaki, Japan), Neraca analitik (Metler, Tolledo, Swiss), *Beker glass* (Iwaki,

Japan), *Magnetic stirrer* (Bain Stead Thermolyne, USA), botol kaca, Lemari pendingin (Sanyo, Japan), pipet tetes, tangki nitrogen cair (Sanyo, Japan), inkubator (Sanyo, Japan), *Tissue Culture Flask (TCF)* (Iwaki, Japan), *Water bath* (Eyela, Japan), Alat sentrifus (Eppendorf, Jerman), *Coverslip* diameter 13 mm, cawan petri (Falcon, NJ, USA), *Laminary airflow cabinet* (Sanyo, Japan), Pipet Eppendorf (Eppendorf, Jerman), mikropipet, *Screw-capped conical tubes* (Falcon, NJ, USA), gelas obyek (Sail Brand)istnt, *cover glass* (Assistent Jerman), pipet, mikroskop cahaya (nikon, Japan), *Tally counter*, mikroskop *inverted* (nikon, Japan), mikroskop *fluorescence* (nikon, Japan), microplate reader (Benchmark, Biorad), kamera digital.

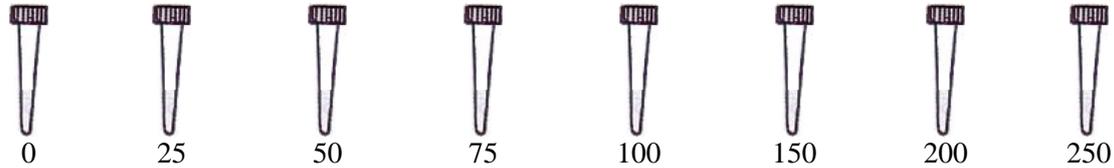
Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Terpadu, FKG, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM), Yogyakarta.

Determinasi buah delima dilakukan pengumpulan dan penentuan jenis buah delima yang akan di ekstraksi. Buah delima yang diperoleh dilakukan determinasi di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pembuatan ekstrak etanol buah delima: ekstraksi adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Buah delima dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 45 °C selama 48 jam sampai kadar air \pm 5%. Buah delima yang sudah kering dijadikan serbuk.

Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk *Simplisia* buah delima dalam etanol 70 % selama 24 jam. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung bahan zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak ke luar. Kemudian disaring dan diulang 3 kali sehingga terjadi keseimbangan kosentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel. Selanjutnya ampas dan filtrat dipisahkan. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *Vacuum rotary evaporator* pemanas *water bath* suhu 70 °C. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental, kemudian dibuat

beberapa konsentrasi. Etanol dipergunakan sebagai bahan pengekstrak karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam Etanol 20 %.

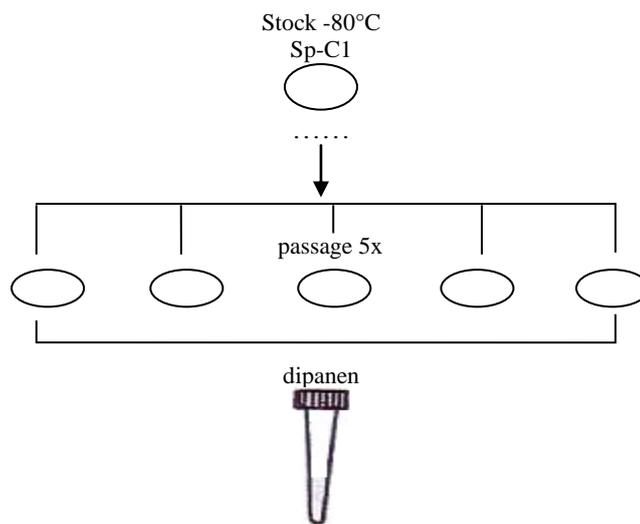
keatas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan panas yang diperlukan dalam proses pemekatan lebih sedikit.



Gambar 1. Ekstrak etanol buah delima dengan konsentrasi 0,25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 µg/ml.

Pengaktifan biakan sel SP-C1: Sel SP - C1 diambil dari tangki nitrogen cair, lalu *defroze* dalam *water bath* pada suhu 37 °C sampai mencair, kemudian disemprot alkohol 70%. Sel dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berisi 10 ml medium RPMI - serum (RPMI ditambah PBS 10%, Penisilin – Streptomisin 3% dan Fungizon 1%) dalam ruang luminary air flow dan sentrifus dengan kecepatan 1200rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah dengan RPMI - serum. Setelah didiamkan 20 menit, sel disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, sisakan 1ml untuk resuspensi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam TCF (*Tissue Culture Flask*) dengan media penumbuh yang mengandung (FBS) 20% dan dilihat dibawah *inverted mikroskop*. Sel hidup nampak bulat, jernih dan bersinar. *Tissue Culture Flask* yang berisi sel diinkubasi

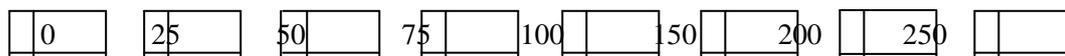
dalam inkubator pada suhu 37 °C dan CO2 5% dengan tutup dikendorkan. Pembiakan sel SP-C1. Sel SP-C1 dari stock dibiakan dalam cawan petri dengan media RPMI ditambah fetal calf serum 10% , streptomisin 100 µg/ml dan penisilin 100 unit/ml . Sel diinkubasi dengan kelembaban udara 95% dan 5% CO2 pada suhu 37°C. Perkembangan sel diamati tiap hari dan media diganti dengan media baru setiap 3 hari sekali. Apabila pertumbuhan sel telah konfluen (medium menjadi kuning dan sel telah memenuhi *flask*), dibiakan pada cawan petri baru. Pembiakan dilakukan sampai dengan *passage* ke lima kemudian sel dapat dipanen untuk kemudian disentrifus pada 2000rpm selama 5 menit. Cairan supernatant dibuang dan disisakan sekitar 1ml untuk suspensi ulang pelet. Setelah suspensi sel homogen, tambahkan media penumbuh yang mengandung FBS 10%, kemudian sel kanker didistribusikan menjadi beberapa TCF.



Gambar 2. Sel dipanen setelah *passage* ke-5

Masing-masing sumuran yang akan diisi sebelumnya diberi cover glass (starvasi), yang diletakkan pada dasar sumuran. Baris A-D kolom 1-8 diisi dengan 3 ml media RPMI, kemudian diisi sel SP - C1 dengan perhitungan (dibutuhkan 25×10^5 sel), $2,5 \times 10^5 / 25 \times 10^5$ sel = 0,1 ml = 100 μ l, jumlah sel $2,5 \times 10^5$ sel/well, selanjutnya di inkubasi dengan inkubator pada suhu 37 °C dan CO2 5% selama 24 jam. Setelah 24 jam, semua cairan dibuang, kemudian dari kolom 1-7 secara berurutan

ditambahkan 5 ml ekstrak etanol buah delima (konsentrasi 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 μ g/ml), sedangkan pada kolom 8 sebagai kontrol, selanjutnya di inkubasi lagi dengan inkubator pada suhu 37 °C dan CO2 5% selama 48 jam. Setelah 48 jam, semua cairan didalam sumuran dibuang, lalu cover glass diambil dan diletakkan pada gelas obyek secara berurutan, sesuai dengan konsentrasi ekstrak etanol yang telah diberikan.



Gambar 3. Gelas obyek uji apoptosis siap diamati dengan mikroskop fluoresence

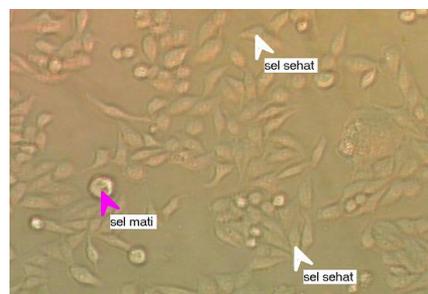
Dilakukan pengecatan dengan kombinasi larutan *Ethidium Bromide* dan *cridine orange* sebanyak 5-10 μ l diteteskan pada cover glass. Selanjutnya preparat diamati dengan mikroskop fluoresence dengan pembesaran 100 - 400 x. Nukleus sel yang utuh berwarna hijau terang adalah sel yang viabel /hidup dan nukleus sel yang berwarna kuning dengan kondensasi kromatin adalah sel yang mengalami apoptosis. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung dalam 100 sel.

Jika hasil uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki distribusi yang tidak normal, analisis bisa dilanjutkan dengan uji *Non Parametrik*. Untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara variabel pengaruh dan variabel terpengaruh dilakukan uji *Kruskal-Wallis* yang diikuti dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara tiap kelompok variabel pengaruh terhadap variabel terpengaruh.

Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, data hasil penelitian uji apoptosis dianalisis dengan uji *Saphiro-Wilk* untuk mengetahui apakah distribusi datanya normal. Jika hasil uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki distribusi yang normal, analisis bisa dilanjutkan dengan uji *Parametrik*. Selanjutnya untuk menguji apakah ada hubungan yang kuat antara variabel pengaruh dan variabel terpengaruh, dilakukan uji korelasi *Pearson* dengan *Confidence Interval (CI)* 95 %. Dilanjutkan dengan analisis *Regresi* untuk memprediksi besarnya nilai variabel pengaruh terhadap variabel terpengaruh. Sebagai syarat uji *ANOVA*, dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui variansi data yang homogen. Syarat uji *ANOVA* adalah adanya distribusi data yang normal dan variansi yang sama. Uji *ANOVA* untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara variabel pengaruh dan variabel terpengaruh. Uji *ANOVA* diikuti dengan uji *LSD* untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara tiap kelompok variabel pengaruh terhadap variabel terpengaruh.

Hasil dan Pembahasan

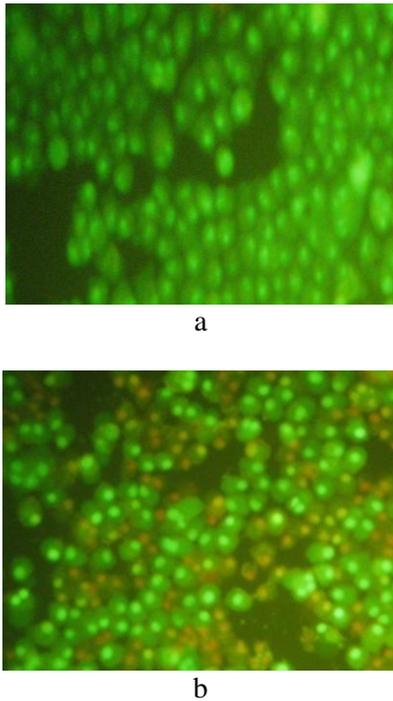
Biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia (SP-C1) dibiakan pada botol kultur jaringan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Nikon) memperlihatkan sel yang hidup menempel pada dasar botol dengan morfologi sel berbentuk pipih, utuh, sitoplasma terang dengan ukuran yang relatif sama.



Gambar 4. Morfologi biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia yang hidup

Uji Apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dilakukan dengan

ekstrak etanol buah delima. Setelah diinkubasi selama 48 jam, diambil *coverslip* dari *microplate 24 well* diletakkan pada *glass object* dibuat sampel pada masing – masing konsentrasi ekstrak etanol buah delima, kemudian ditetesi dengan pewarnaan *Ethidium Bromide* dan *Acridine Orange*, selanjutnya diamati di bawah mikroskop *fluorescence* dengan perbesaran 40x. Sel yang hidup berwarna hijau sedangkan sel yang mengalami apoptosis berwarna kuning disebabkan ikatan polipeptid.



Gambar 5. Biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia pasca uji apoptosis kontrol, (b) ekstrak etanol buah delima 150 µg/ml

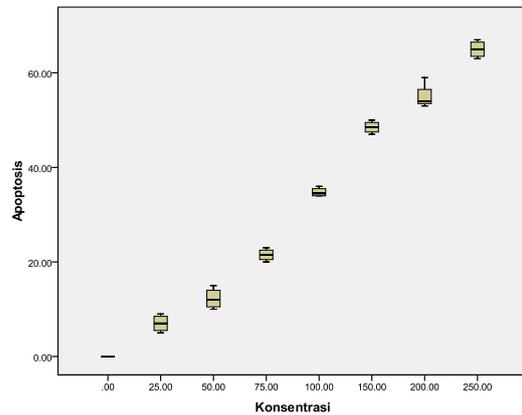
Perhitungan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dalam 100 sel. Hasil perhitungan merupakan persentase apoptosis sel yang disajikan dalam Tabel I berikut :

Tabel 1. Persentase apoptosis sel terhadap konsentrasi ekstrak etanol buah delima

Bahan	No	Konsentrasi (µg/ml)	Rerata Persentase Apoptosis ± SD (dalam %)
Ekstrak Etanol	1	0 (Kontrol)	0
	2	25	7 ± 1,83

Buah Delima		
3	50	12 ± 2,22
4	75	22 ± 1,29
5	100	35 ± 0,96
6	150	49 ± 1,29
7	200	55 ± 2,71
8	250	65 ± 2,06

Persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol buah delima. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol buah delima yang diberikan, semakin besar persentase apoptosis yang terjadi. Konsentrasi ekstrak etanol buah delima yang paling besar menyebabkan apoptosis adalah 250µg/ml, rata-rata persentase apoptosis yang terjadi 65%, sedangkan konsentrasi ekstrak etanol buah delima yang paling sedikit menyebabkan apoptosis adalah 25 µg/ml, rata-rata persentase apoptosis yang terjadi 7%. Pada kelompok kontrol tidak terjadi apoptosis sel. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Rerata persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia setelah perlakuan dengan ekstrak etanol buah delima

Hasil tersebut kemudian dianalisis dengan uji *Saphiro-Wilk* untuk uji normalitas data untuk memastikan distribusi datanya normal seperti ditunjukkan pada Tabel 2 .

Tabel 2. Hasil uji analisis *Saphiro-Wilk* untuk uji normalitas data (sebagai syarat uji *Parametrik*)

Variabel	p
Persentase apoptosis sel terhadap konsentrasi ekstrak etanol buah delima	0,78(*)

Keterangan : p = nilai probabilitas

(*) = bermakna bila $p > 0,05$

Dari hasil uji *Saphiro-Wilk*, data persentase apoptosis sel terhadap perlakuan dengan ekstrak etanol buah delima menunjukkan nilai probabilitas lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga data tersebut memiliki distribusi yang normal dan memenuhi syarat untuk dilakukan uji *Parametrik*. Uji Korelasi *Pearson* antara berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap apoptosis ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Korelasi *Pearson* Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Delima terhadap Apoptosis Sel SP-C1

Korelasi <i>Pearson</i>	r	p
Konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap apoptosis sel	0,984**	0,000(*)

Keterangan : r = angka koefisien korelasi perhitungan
p = nilai probabilitas
(*) = bermakna bila $p < 0,05$

Nilai koefisien korelasi (r) pada Tabel 3 sebesar 0,984 bertanda positif kuat menunjukkan adanya korelasi atau hubungan positif (searah) antara konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap persentase apoptosis sel karsinoma skuamosa lidah manusia, artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol buah delima yang diberikan, semakin besar persentase apoptosis yang terjadi. Hal tersebut juga tampak pada gambar 19 yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap rerata persentase apoptosis.

Nilai probabilitas (p) pada Tabel 3 sebesar 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi 0,05 ($p < 0,05$). Hal ini berarti terdapat korelasi yang sangat bermakna atau hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia pada taraf kepercayaan 95 %.

Setelah itu dilakukan uji hipotesis dengan korelasi *Pearson*, menggunakan analisis regresi sederhana untuk memprediksi nilai suatu variabel terpengaruh (persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia), berdasarkan variabel pengaruh (konsentrasi ekstrak etanol buah delima). Hasil analisis regresi sederhana dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji analisis regresi sederhana antara konsentrasi ekstrak etanol buah delima terhadap persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia.

Kelompok	r	R (r kuadrat)	p
Persentase apoptosis biakan sel oleh konsentrasi ekstrak etanol buah delima	0,984	0,968	0,000(*)

Keterangan : r = angka koefisien korelasi
R = persentase persamaan
P = nilai probabilitas
(*) = bermakna bila $p < 0,05$

Nilai probabilitas yang diperoleh kurang dari 0,05, hal ini berarti syarat rumus regresi telah terpenuhi. Nilai R (r kuadrat) menunjukkan besarnya persentase variabel pengaruh (konsentrasi ekstrak etanol buah delima) terhadap variabel terpengaruh (persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia). Dari hasil analisis regresi 96,8 % apoptosis disebabkan oleh ekstrak etanol buah delima, sisanya 3,2 % oleh faktor lain.

Selanjutnya untuk melihat perbedaan variansi persentase apoptosis, dianalisis dengan uji *ANOVA*. Syarat untuk bisa dilakukan uji *ANOVA* adalah adanya distribusi data yang normal dan variansi yang sama. Untuk menguji normalitas distribusi data dengan uji *Saphiro-Wilk* (Tabel 5) dan untuk mengetahui variansi yang homogen dengan *Levene test* (Tabel 6).

Tabel 5 Hasil uji *Saphiro-Wilk* persentase apoptosis perlakuan dengan ekstrak etanol buah delima

Bahan uji	Konsentrasi	P
Ekstrak etanol buah delima	25	0,714(*)
	50	0,798(*)
	75	0,972(*)

100	0,272(*)
150	0,972(*)
200	0,062(*)
250	0,714(*)

Keterangan : p = nilai probabilitas
(*) = bermakna bila $p > 0,05$

Tabel 6 Hasil uji *Levene test* untuk melihat persamaan variansi

<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	P
3.351	7	24	0,012

Keterangan :
df = derajat kebebasan
P = nilai probabilitas
(*) = bermakna bila $p > 0,05$

Uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan keseluruhan nilai probabilitas bermakna, yaitu lebih besar dari 0,05 (Tabel 5). Hal ini berarti data memiliki distribusi normal. Hasil uji persamaan variansi (Tabel 6) menunjukkan nilai probabilitas lebih besar dari 0,05 yang berarti data homogen atau tidak terdapat perbedaan bermakna variansi antar kelompok. Sehingga memenuhi syarat untuk dapat dilakukan analisis *One Way ANOVA* (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil analisis *ANOVA* satu jalur

	Jumlah Kuadrat	db	Rerata	F	p
Antar kel.	16047,719	7	2292,531	761,533	0,000(*)
Dalam kel.	72,250	24	3,010		
Total	16119,969	31			

Keterangan :
db = derajat kebebasan
F = nilai statistik
p = nilai probabilitas
(*) = bermakna bila $p < 0,05$

Hasil analisis *ANOVA* satu jalur (Tabel 7) menunjukkan nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$), ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok yang dibandingkan. Untuk mengetahui, perbedaan rerata persentase apoptosis tiap kelompok

dilakukan uji Post Hoc menggunakan Uji *Least Significance Difference / LSD*. Hasil uji *LSD* menunjukkan nilai p kurang dari 0,05 ($p < 0,05$), ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara tiap kelompok konsentrasi dengan rerata persentase apoptosis.

Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Ekstrak etanol buah delima dapat meningkatkan apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia yang ditandai dengan semakin besar persentase apoptosis yang terjadi. Konsentrasi 250 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak etanol buah delima mempunyai persentase apoptosis sebesar 67% terhadap se SP-C1.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan isolasi *polifenol* dari buah delima yang merupakan senyawa aktifnya.

Daftar Pustaka

- Adeyemi, B. F., Adekunle, L.V., Kolude, B. M., Akang, E. E. U., dan Lawoyin, J. O. 2008, Head and Neck Cancer—A Clinicopathological Study in a Tertiary Care Center, *J Natl Med Assoc*, 100 (6) : 690-697.
- Barasch, A., Safford, M., dan Einsenberg, E. 1998. Oral Cancer and Oral Effects of Anticancer Therapy, *Mt. Sinai J. Med.*, 65 (5-6) : 370-377.
- Boik, J. 2001. *Natural Compounds in Cancer Therapy*, Quality Book Inc : Minnesota.
- Bsoul, S. A., Huber, M. A., dan Terenzhalmy, G. T., 2005, Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tissues : A Comprehensive Review for Oral Health Care Providers, *J. Contempt. Dent. Practice*, 6(4) : 001-016.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70.
- Hill, A. F., 1952, *Economic Botany : A Textbook of Useful Plants and Plants Product*, 2ⁿ edition, McGraw Hill Book Company : New York.

Lynch MA, Brightman V. J and Greenberg, M. S. 1994. *Burket Ilmu Penyakit Mulut, Diagnosis dan Terapi (terj)*, Binarupa Aksara, Jakarta

Neville, B. W., dan Day, T. A. 2002. Oral Cancer and Precancerous Lesions, *CA Cancer J. Clin.*, 52: 195-215.

Sakuma, T., Uzawa, K., Onda, T., Shiba, M., Yokoe, H., Shihabara, T., dan Tanzawa, H. 2006. Aberrant Expression of Histone Deacetylase 6 in Oral Squamous Cell Carcinoma, *Int J Oncol*, 29 : 117-124.

Siegelmann - Danieli, N., Izhack, O. B., Hanlon, A., Ridge, J. A., Stein, M. E., Khandelwal, V., dan Langer, C. J. 2005. *p53* Alteration in Oral Tongue Cancer is not

Significantly Assosiated with Age at Diagnosis or Tobacco Exposure, *Tumori*, 91: 346-350.

Silveira, E. J. D., Godoy, G. P., Lins, R. D. A. U, Arruda, M. L. S, Ramos, C. C. F., Freitas, R.A., dan Querioz, L. M. G. 2007. Correlation of Clinical, Histological, and Cytokeratin Profiles of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue With

Supriatno. 2008. *Cis-platinum Meningkatkan Apoptosis dan Hambatan Invasi Sel Kanker Lidah Manusia in vitro*, *MIKGI*, 10 (1) : 75-78.