

**INDUKSI APOPTOSIS PADA TIKUS PUTIH *SPRAGUE DAWLEY* SEBAGAI HEWAN
MODEL KANKER LIDAH
DENGAN EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH DELIMA**

Mahmud Kholifa

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Correspondence to : Mahmud Kholifa

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email : mahmudkholifa@yahoo.com

Abstract

To current, All cancer therapies are expensive and have side effects that are not expected and still have risk of secondary cancer in the head and neck. Therefore in need of a new strategy supportive treatment of cancer without surgery, radiation or chemotherapy as a treatment alternative that is cheaper and safer. The purpose of this study was to test ability concentration of ethanol extract of pomegranate seeds as anti-cancer in Sprague Dawley Rats The method used with measure the diameter of cancers in Sprague Dawley Rats after treatment with ethanol extract of pomegranate seeds. Results are expected for the discovery of new anti-cancer from herbal ingredients, especially ethanol extract of pomegranate seeds. In conclusion, the concentration of ethanol extract of pomegranate seeds influential as an anti - cancer on human tongue squamous cell carcinoma in Sprague Dawley Rats and the increases of concentration of ethanol extract of pomegranate seeds followed by a decrease in the size of the diameter of cancer in Sprague Dawley Rats

Keywords : *tongue cancer, anti-cancer, apoptosis, ethanol extract of pomegranate seeds, herbal ingredients.*

1. PENDAHULUAN

Pertumbuhan jaringan terjadi dari proliferasi dan apoptosis. Pada individu yang normal, pertumbuhan jaringan terkontrol sehingga terjadi keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis. Pada individu yang rentan, pertumbuhan jaringan tidak terkontrol, akibatnya terjadi ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis (Ponder, 2001). Kanker adalah pertumbuhan jaringan yang tidak terkontrol akibat adanya gangguan mekanisme normal yang mengatur keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis (Myers, 1996).

Semua terapi kanker saat ini selain mahal dan mempunyai efek samping yang tidak diharapkan juga masih beresiko akan timbulnya kanker sekunder pada daerah kepala dan leher (Amemiya dkk., 2005). Oleh sebab itu di perlukan strategi baru terapi suportif kanker tanpa operasi, radiasi maupun kemoterapi sebagai alternatif pengobatan yang lebih murah dan aman (Gerl dan Vaux, 2005).

Pada penelitian ini tikus disuntik dengan sel kanker yang berasal dari karsinoma sel skuamosa lidah manusia secara sub cutan. Setelah tumbuh benjolan dengan ukuran 1 cm diberi perlakuan dengan ekstrak biji delima yang mengandung flavonoid dan bersifat antioksidan setiap hari. Hasil yang diharapkan pada penelitian ini berupa analisis ekstrak etanol biji buah delima yang diberikan bisa menyebabkan penurunan ukuran benjolan kanker pada tubuh tikus.

2. METODE

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Sprague Dawley Rats*. Tahap yang dilakukan dalam penelitian ini adalah preparasi *Sprague Dawley Rats*, penanaman sel SP-C1 pada *Sprague Dawley Rats*, Pemberian ekstrak biji delima sebagai anti kanker pada *Sprague Dawley Rats*, nekropsi tikus, kemudian dilanjutkan pengamatan untuk mengukur penurunan diameter kanker.

Preparasi *Sprague Dawley Rats* dilakukan dengan mengelompokkan 15 ekor *Sprague Dawley Rats* menjadi lima kelompok yang terdiri dari kelompok A, B, C, D dan E.

Masing – masing kelompok terdiri dari 3 ekor *Sprague Dawley Rats* yang akan mendapat 5 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan tersebut adalah tikus kelompok perlakuan kontrol negatif, kontrol positif, dosis 250, dosis 500, dan dosis 1000 mg/BB. Selanjutnya tiap – tiap kelompok dimasukkan kandang supaya beradaptasi selama dua minggu untuk menyeragamkan cara hidup, makan dan kondisi kandang percobaan. Semua tikus diberikan pakan komersial dan air secara *ad libitum* (bebas). *Bedding* (alas) tikus berasal serbuk gergaji kasar yang disterilisasi dan dilakukan penggantian seminggu 2 kali. Pencahayaan menggunakan cahaya alami (dari jendela) dengan suhu ruang (normal). Kandang juga dilengkapi *exhaust fan* untuk menjaga aliran udara dan membuang panas berlebih.

Penanaman sel SP-C1 pada *Sprague Dawley Rats*. Sebelum dilakukan penanaman, sel SP-C1 beku diambil dari tangki nitrogen cair, lalu dicairkan dalam *water bath* pada suhu 37 °C. Selanjutnya ditambahkan 10 ml medium DMEM – serum dalam ruang luminary air flow dan di sentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Endapan yang terjadi di tambah media DMEM – serum dan didiamkan selama 20 menit, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan di buang dan di sisakan 1 ml untuk resuspensi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam *Tissue Culture Flak* dengan media penumbuh yang mengandung (FBS) 20% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dan CO2 5% dengan tutup dikendorkan. Selanjutnya diamati dibawah inverted mikroskop. Sel yang hidup nampak bulat jernih dan bersinar. Sel kanker yang hidup disuntikkan pada masing - masing kelompok tikus dengan dosis yang sama secara sub cutan. Setelah penanaman sel kanker pada tubuh *Sprague Dawley Rats*, dilakukan pengamatan sampai tumbuh benjolan. Ekstrak biji delima belum diberikan pada saat kemunculan tumor (pada hari ke-1 masa perlakuan) yang terasa dengan ujung jari pada saat palpasi, namun diberikan air dan pakan standar secara *ad libitum*.

Ekstrak baru mulai diberikan secara oral pada hari berikutnya setelah pertumbuhan benjolan. Tikus kelompok perlakuan diberikan

sekali setiap hari selama 30 hari (hingga hari ke-31 masa perlakuan). Tikus kelompok kontrol negatif tidak diberikan. Tikus kelompok kontrol positif diberikan Doxorubicin dengan dosis 50 L/kg BB per kali penyuntikan. Doxorubicin diberikan 3 kali, yakni pada hari ke-2, ke-9, dan ke-16 (terhitung semenjak tumor pertama kali terdeteksi). Palpasi tidak dilakukan setiap hari untuk mencegah stress. Tangan yang memegang erat tikus saat palpasi harus memakai dua lapis sarung tangan karet untuk mencegah cakaran dan gigitan yang menyebabkan luka infeksi.

Pada hari ke 32 dilakukan nekropsi tikus. Nekropsi diawali dengan pembiusan menggunakan eter dalam wadah tertutup sampai tikus pingsan lalu di dislokasi leher kemudian dibedah. Tumor diambil dan diukur diameternya. Tumor diawetkan dalam formalin 10% (yang mengandung larutan penyangga fosfat), disimpan dalam tabung silinder plastik, ditutup rapat, dan diberi label.

Data pengamatan diperoleh dengan mengukur diameter tumor, sehingga bisa dihitung volume tumor. Total volume tumor didapat dari penjumlahan volume tumor pada masing-masing kelompok tikus. Rerata volume tumor merupakan volume rata-rata dari setiap kelompok tikus.

Masa perlakuan menggambarkan saat dimana tumor mulai muncul (terhitung sebagai hari ke-1) hingga saat tikus dibedah (hari ke-32).

3. HASIL

Hasil perhitungan rerata volume tumor untuk setiap perlakuan ditampilkan pada tabel 1, tikus pada kelompok kontrol positif memiliki volume rerata tumor terendah, yakni sebesar 287,41 mm³, disusul berturut-turut kelompok dosis 4 sebesar 382.3 mm³, kelompok dosis 3 sebesar 429,95 mm³, kelompok dosis 2 sebesar 437,57 mm³ dan yang terbesar kelompok kontrol negatif dengan nilai 1.127.54 mm³.

Tabel I. Kelompok Perlakuan dan Rerata volume tumor

Bahan	No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata Volume Tumor \pm SD (dalam mm^3)
	1	0(Kontrol)	1.127,54 \pm 0,19
Ekstrak	2	250	453,81 \pm 0,03
Etanol Biji	3	500	429,95 \pm 0,17
Delima	4	1000	382,28 \pm 0,05
	5	Doxorubicin	287,41 \pm 0,16

Kenyataan bahwa pemberian ketiga dosis ekstrak etanol biji delima (dosis 2, 3 dan 4) cukup efektif menekan rerata volume tumor. Pemberian dosis ekstrak pada tikus menghasilkan nilai volume rerata tumor yang jauh dibawah kontrol negatif namun masih belum bisa menyamai nilai volume rerata tumor tikus yang diberikan doxorubicin.

Untuk memastikan distribusi datanya normal, hasil pada tabel 1 kemudian dianalisis dengan uji *Saphiro-Wilk*, seperti pada tabel II dengan hipotesis H_0 : Data sampel berdistribusi normal, H_a : Data sampel tidak berdistribusi normal dengan $\alpha = 0,05$, daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

Tabel II. Distribusi data Rerata volume tumor

Materi Uji	Konsentrasi	P
	0(Kontrol)	.911(*)
	250	.958(*)
Ekstrak Etanol	500	.363(*)
Biji Delima	1000	.363(*)
	Doxorubicin	.593(*)

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

Uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan keseluruhan nilai probabilitas bermakna, yaitu lebih besar dari 0,05 (Tabel II). Karena nilai $p > \alpha$ maka H_0 diterima, kesimpulannya berarti data sampel penurunan rerata volume tumor memiliki distribusi normal.

Selanjutnya untuk mengetahui variansi yang homogen dengan *Levene test* (Tabel III) dengan hipotesis H_0 : Variansi semua sampel identik, H_a : Variansi semua sampel tidak identik dengan $\alpha = 0,05$, daerah khusus : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

Tabel III. Persamaan variansi Rerata volume tumor

Levene Statistic	df1	df2	P
0.897	4	10	0,501

Keterangan :

df = derajat kebebasan

P = nilai probabilitas

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

Hasil uji persamaan variansi (Tabel III) menunjukkan nilai probabilitas lebih besar dari α ($0,501 > 0,05$) maka H_0 diterima, kesimpulannya H_0 diterima sehingga variansi semua sampel identik yang berarti data homogen atau tidak terdapat perbedaan bermakna variansi antar kelompok, sehingga memenuhi syarat untuk dapat dilakukan analisis *One Way ANOVA* (Tabel IV) dengan hipotesis H_0 : Rata-rata penurunan volume tumor identik, H_a : Rata-rata penurunan volume tumor tidak identik dengan $\alpha = 0,05$, daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

Tabel IV. Hasil analisis *ANOVA* satu jalur terhadap nilai rerata penurunan volume tumor.

	Jumlah Kuadrat	df	Rerata Kuadrat	F	p.
Antar Kelompok	1360042,354	4	340010,589	10520000,0	0,000(*)
Dalam Kelompok	0,323	10	0,032		
Total	1360042,677	14			

Keterangan :

db = derajat kebebasan

F = nilai statistik

p = nilai probabilitas

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

Dari hasil analisis *ANOVA* satu jalur (Tabel IV) menunjukkan nilai $p = 0,000$, karena nilai p lebih kecil dari α ($0,000 < 0,05$), maka H_0 ditolak, kesimpulannya H_a diterima sehingga rata-rata penurunan volume tumor tidak identik yang berarti terdapat perbedaan bermakna rata-rata penurunan volume tumor dengan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji delima.

Setelah mengetahui hasil uji Anova bahwa rata-rata penurunan volume tumor tersebut berbeda secara signifikan, maka untuk mengetahui, perbedaan rerata penurunan

volume tumor kelompok mana saja yang memiliki nilai berbeda dapat dilakukan uji lanjut dengan uji Post Hoc (Uji *Least Significance Difference / LSD*), seperti ditampilkan pada tabel V, dengan hipotesis H_0 adalah rata-rata penurunan volume tumor $i = j$ dan H_a adalah rata-rata penurunan volume tumor $i < j$ dengan keterangan i dan j = kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak etanol biji delima kontrol negatif, 250, 500, 1000 mg/ml, kontrol positif dengan $\alpha = 0,05$, daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

Tabel V. Hasil Uji LSD Antar Tiap Kelompok Perlakuan dan Penurunan Rerata Volume Tumor

Multiple Comparisons

Volume

LSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	250	673.72667 [*]	.14676	.000	673.3997	674.0537
	500	697.59000 [*]	.14676	.000	697.2630	697.9170
	1000	745.26000 [*]	.14676	.000	744.9330	745.5870
	1500	840.13000 [*]	.14676	.000	839.8030	840.4570
250	0	-673.72667 [*]	.14676	.000	-674.0537	-673.3997
	500	23.86333 [*]	.14676	.000	23.5363	24.1903
	1000	71.53333 [*]	.14676	.000	71.2063	71.8603
	1500	166.40333 [*]	.14676	.000	166.0763	166.7303
500	0	-697.59000 [*]	.14676	.000	-697.9170	-697.2630
	250	-23.86333 [*]	.14676	.000	-24.1903	-23.5363
	1000	47.67000 [*]	.14676	.000	47.3430	47.9970
	1500	142.54000 [*]	.14676	.000	142.2130	142.8670
1000	0	-745.26000 [*]	.14676	.000	-745.5870	-744.9330
	250	-71.53333 [*]	.14676	.000	-71.8603	-71.2063
	500	-47.67000 [*]	.14676	.000	-47.9970	-47.3430
	1500	94.87000 [*]	.14676	.000	94.5430	95.1970
1500	0	-840.13000 [*]	.14676	.000	-840.4570	-839.8030
	250	-166.40333 [*]	.14676	.000	-166.7303	-166.0763
	500	-142.54000 [*]	.14676	.000	-142.8670	-142.2130
	1000	-94.87000 [*]	.14676	.000	-95.1970	-94.5430

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Dari hasil uji *LSD* menunjukkan nilai *p* yang kurang dari 0,05 adalah antara kelompok kontrol dengan 250 mg/BB yaitu 0.000, antara kelompok kontrol dengan 500 mg/BB yaitu 0.000, antara kelompok kontrol dengan 1000 mg/BB yaitu 0.000, demikian juga antara kelompok dosis yang lainnya semua menunjukkan nilai *p* yang kurang dari 0,05. Karena antara semua kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak etanol biji delima nilai $p < \alpha$ ($p < 0,05$) maka H_0 ditolak, kesimpulannya H_a diterima sehingga rata-rata ukuran volume tumor antara semua kelompok perlakuan tidak identik yang berarti terdapat perbedaan bermakna rata-rata ukuran volume tumor antara tiap kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji delima.

Semakin besar konsentrasi ekstrak etanol biji delima yang diberikan maka akan semakin besar pula penurunan ukuran tumor yang terjadi. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol biji delima secara signifikan akan menurunkan ukuran volume tumor sel kanker lidah.

4. PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini di dapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan ekstrak etanol biji delima terhadap ukuran volume tumor sel kanker lidah manusia. Hal ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Koyama dkk (2010), *Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF- IGF1R axis*, di peroleh hasil bahwa pemberian ekstrak buah delima 100 µg/ml dapat menghambat proliferasi sel dan meningkatkan apoptosis pada kanker prostat. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan Ramos (2007) pemberian selama 3 hari dengan dosis 20 – 500µmol/L menunjukkan *flavonoids* menginduksi apoptosis pada biakan sel kanker paru, kanker payudara, kanker prostat dan kanker usus. Penelitian yang dilakukan Mahmud dkk (2011), tentang *Pengaruh ekstrak etanol buah delima terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia SP-C1*, bahwa pemberian ekstrak etanol buah delima 250 µg/ml pada biakan sel kanker lidah dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis.

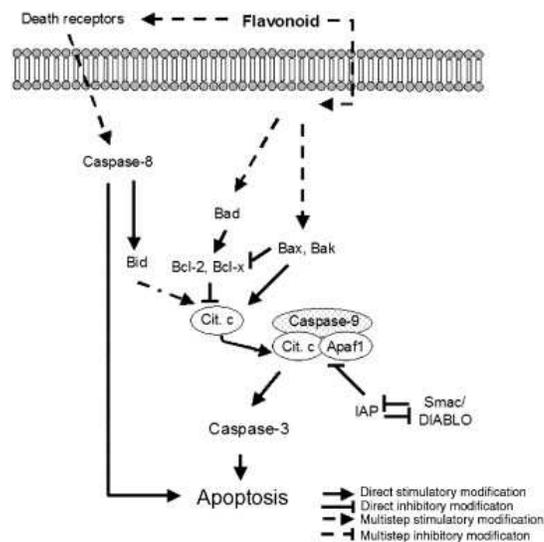
Secara teori delima kaya akan kandungan fitokimia yang bersifat antioksidan yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dan memulihkan pengerasan pada dinding arteri. Delima mempunyai kandungan polifenol, tannin dan anthocyanins, khususnya di dalam polifenol mengandung 60% *flavonoids*. *Flavonoids* menginduksi apoptosis dengan meningkatkan komponen proapoptotic (Ramos, 2007), yang dapat menurunkan resiko penyakit kronis termasuk sel kanker. Untuk mengikat kandungan zat aktif dari buah delima dilakukan ekstraksi dengan etanol 70%. Etanol 70 % dipilih karena memiliki beberapa kelebihan yaitu netral dan absorbsinya baik, tidak mengalami perubahan struktur pada pemanasan, tidak toksis, kuman sulit tumbuh pada konsentrasi diatas 20%.

Secara umum, pemberian ekstrak etanol biji delima pada dosis tertinggi (1.000 mg/kg BB), dosis 500 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB, terbukti efektif dalam menekan ukuran volume tumor, namun efek antikankernya secara umum masih berada dibawah kontrol positif.

Adanya perbedaan yang bermakna terhadap penurunan volume tumor pada penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol biji delima memiliki khasiat terapeutik sebagai antikanker disamping khasiat yang lain seperti anti bakteri, anti virus, dan antioksidan. Hal ini sesuai dengan teori bahwa buah delima memiliki kandungan *Flavonoid* terutama di dalam biji buah delima. *Flavonoid* menginduksi apoptosis pada sel kanker melalui jalur intrinsik atau mitokondria. Pada kanker terjadi hilangnya fungsi *p53* sebagai *tumor suppressor gene* yang mengakibatkan terjadinya resistensi terhadap apoptosis (Hanahan dan Einberg, 2000). Pada perawatan kanker, *flavonoid* menghambat proses tomorigenesis melalui induksi *p53*, pengaturan rasio *Bax/Bcl-2*, induksi *caspase*. Aktivasi *p53* akan menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi *Bax* pada rantai diantara promoter, dan menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi *Bcl-2*, yang mengubah rasio *Bax/Bcl-2* dan memulai aktivitas apoptosis (Archer dkk.,

2000), yang menyebabkan terhentinya siklus sel.

Aktivasi *Bax* akan memulai jalur apoptosis intrinsik yang memfasilitasi terlepasnya *cytochrome c* mitokondria yang kemudian mengaktifkan *caspase 9* (Fan dkk., 2005). *Cytochrome c* akan dilepaskan jika terjadi kerusakan mitokondria, sehingga akan mengaktifkan *Caspase-9* yang merupakan *apical caspase* dari jalur *cytochrome c* yang berfungsi sebagai sensor gangguan fungsi membran barrier mitokondria (Krawjewski, 1999). Terlepasnya *cytochrome c* bersama dengan *caspase 9* dan *Apaf-1* akan membentuk *apoptosome*.



Gambar 1. Mekanisme anti tumor oleh Flavonoid.

Aktivasi *caspase 9* kemudian akan mengaktifkan *caspase 3* yang merupakan *effector caspase* (Fan dkk., 2005). *Caspase-3* akan mengaktifkan *endonuclease caspase* sehingga mengaktifkan DNase, yang akan menyebabkan fragmentasi DNA. Fragmentasi DNA merupakan salah satu karakteristik apoptosis (O' Donovan, 2003).

5. SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

1. Pemberian dosis ekstrak etanol biji buah delima berpotensi sebagai anti

kanker terhadap penekanan ukuran volume tumor pada tikus percobaan.

2. Pemberian dosis ekstrak etanol biji buah delima yang tertinggi terbukti lebih efektif dalam menekan rerata ukuran tumor dibandingkan dosis ekstrak etanol biji buah delima yang lain, namun masih lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan kontrol positif.

6. SARAN

Bedasarkan hasil penelitian yang dilakukan, saran yang dapat diberikan adalah :

1. Perlu dilakukan perbaikan metode penelitian untuk memastikan tikus mendapat tingkat paparan stress yang sama.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek ekstrak pada pengobatan kanker jangka panjang.
3. Hasil penelitian ini cukup menjanjikan. Meskipun bisa dilakukan perhitungan untuk mengkonversi dosis pada tikus menjadi dosis untuk manusia, namun masyarakat belum dianjurkan untuk mengkonsumsi ekstrak etanol biji delima sebelum dilakukan penelitian lebih lanjut.

Persantunan

Terima kasih kami ucapkan kepada Tim Mitra Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada yang telah bekerjasama dan menyediakan fasilitas untuk keperluan penelitian ini

1. 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.
- Alvi, A. Myers E. N, Johnson, J. T., 2009, *Cancer of the Oral Cavity*, dalam : Myers E.N., dan Suen, J. T., (eds.),*Cancer of the Head and Neck*,W.B. Saunders Company, Philadelphia, h. 321-353.

- Amemiya, K., Shibuya, H., Yoshimura, R., dan Okada, N., 2005, The Risk Of Radiation-Induced Cancer in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and its Result of Treatment, *Brit J Rad*, 78 : 1028-1033.
- Barasch, A., Safford, M., dan Einsenberg, E., 2008, Oral Cancer and Oral Effects of Anticancer Therapy, *Mt. Sinai J. Med.*, 65 (5-6) : 370-377.
- Boik, J., 2011, *Natural Compounds in Cancer Therapy*, Quality Book Inc :Minnesota.
- Chen, M., Guerrero, A. D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T., dan Wang, J., 2007, Caspase-9-induced Mitochondrial Disruption through Cleavage of Anti-apoptotic BCL - 2 Family Members, *J Biol Chem*, 282 (46) : 33888 - 33895, www.ibc.org, 24/05/2009.
- Elrod, H. A. Dan Sun S. Y., 2008, PPAR γ and Apoptosis in Cancer, *PPAR Research*, 1-7.
- Gerl, R. dan Vaux, D. L., 2007, Apoptosis in the Development and Treatment of Cancer, *Carcinogenesis*, 26(2) : 263-270.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R. A., 2010, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70.
- Katayama, A., Bandoh, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T, Nonaka, S., dan Harabuchi, Y., 2009, Expressions of Matrix Metalloproteinases in Early - Stage Oral Squamous Cell Carcinoma as Predictive Indicators for Tumor Metastases and Prognosis, *Clin Cancer Res*, 10 : 634-640.
- Lynch MA, Brightman V. J and Greenberg, M. S., 1994, *Burket Ilmu Penyakit Mulut, Diagnosis dan Terapi (terj)*, Binarupa Aksara, Jakarta
- Loro, L. L., Vintermyr, O. K., dan Johannessen, A. C., 2010, Apoptosis in Normal and Diseased Oral Tissues, *Oral Diseases*, 11 : 274-287, <http://www.blackwellmunksgaard.com>, 21/04/09.
- Myers, J. N, 2007, *Molecular Pathogenesis of Squamous Cell Carcinoma of the Head And Neck*, dalam : Myers, E. N., dan Suen, J. T., (ed.), *Cancer of the Head and Neck*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, h. 5 - 13.
- Neville, B. W., dan Day, T. A., 2008, Oral Cancer and Precancerous Lesions, *CA Cancer J. Clin.*, 52: 195-215, <http://caonline.amcancersoc.org>, 10/07/2009.
- Sakuma, T., Uzawa, K., Onda, T., Shiba, M., Yokoe, H., Shihabara, T., dan Tanzawa, H., 2006, Aberrant Expression of Histone Deacetylase6 in Oral Squamous Cell Carcinoma, *Int J Oncol*, 29 : 117-124.
- Scully, C., 2003, *Oral and Maxillofacial Medicine*, Elsevier : Edinburg.
- Shibuya, Y., Tanimoto, H., Umeda, M., Yokoo, S., dan Komori, T., 2004, Induction Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and 5 - fluorouracil for Tongue Cancer, *Kobe J. Med. Sci.*, 1 (50) : 1-7.
- 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 Associated with Age at Diagnosis or Tobacco Exposure, *Tumori*, 91: 346-350.
- Silva M. R., Oliveira L. H. S., Castro M. C. R., Aquino A. M., Cuzzi T., 2008, Human papilloma virus and squamous - cell carcinoma of the oral cavity, *J Egypt wom Dermatol Soc.*, 5 (1): 22-23
- 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.,