

PENGARUH KONSENTRASI EKSTRAK ETANOL BONGGOL NANAS (*Ananas comosus* (L.) Merr) TERHADAP APOPTOSIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA LIDAH MANUSIA

THE EFFECT OF PINEAPPLE STEM ETHANOL EXTRACT OF (*Ananas comosus* (L.) TO APOPTOSIS OF ORAL TONGUE SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE

Fimma Naritasari^{1*}, Hendri Susanto², Supriatno²

¹ Fakultas Kedokteran Gigi, UGM

² Bagian Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, UGM

ABSTRAK

Karsinoma sel skuamosa lidah merupakan salah satu keganasan yang sering terjadi di rongga mulut. Perawatan yang ada saat ini meliputi pembedahan, radioterapi, kemoterapi, maupun kombinasi ketiganya. Salah satu perawatan yang sedang dikembangkan antara lain adalah pencarian bahan alam/herbal yang dapat menginduksi apoptosis sel kanker. Bromelain memiliki potensi antikanker salah satunya dengan menginduksi apoptosis. Bonggol nanas merupakan salah satu bahan herbal yang potensial dikembangkan untuk perawatan alternatif karena adanya kandungan enzim bromelain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas terhadap apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia. Biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia diberi perlakuan ekstrak etanol bonggol nanas tiga konsentrasi dibawah nilai IC_{50} , yang diperoleh dari uji sitotoksitas, yaitu konsentrasi 5.000, 5.500, dan 6.000 $\mu\text{g/ml}$. Pada uji apoptosis, setelah diinkubasi selama 24 jam, sel diwarnai dengan flurokrom ethidium bromide dan acridine orange. Pengamatan dan perhitungan dilakukan di bawah mikroskop flurescence. Sel hidup tercat berwarna hijau, dan sel yang mengalami apoptosis berwarna kuning hingga oranye. Analisis probit digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} ekstrak etanol bonggol nanas dan Uji korelasi pearson digunakan untuk mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dengan prosentase sel apoptosis. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak etanol bonggol nanas pada biakan karsinoma sel skuamosa lidah. Penelitian ini juga menunjukkan terdapat hubungan positif antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan apoptosis ($r = 0,999$, $p < 0,05$). Kesimpulan pada penelitian ini adalah bahwa bonggol nanas mampu menginduksi apoptosis dan terdapat peningkatan persentase apoptosis sel yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas.

Kata kunci : karsinoma sel skuamosa lidah, ekstrak etanol bonggol nanas, apoptosis

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is one of the most common malignancy in the oral cavity. Currently, cancer treatment using surgery, radiotherapy, chemotherapy and its combination. New strategy for cancer therapy is by searching herbal which can induce apoptosis. Bromelain is one of a potential anticancer agent that can induce apoptosis. Pineapple stem is one of a potential herbal medicine because of its bromelain enzyme content. The aim of this study was to investigate the relation between pineapple stem ethanol extract and apoptosis of oral tongue squamous cell carcinoma cell line. Oral tongue squamous cell carcinoma cell line was treated with three concentrations under IC_{50} of pineapple stem ethanol extract, including 5.000, 5.500, 6.000 $\mu\text{g/ml}$. In apoptosis test, cell stained with fluorochrome ethidium bromide and acridine orange after 24 hours incubation. Fluorescence microscope was used for counting the cell. Viable cell would be stained green and apoptotic cell would be stained yellow to orange. Probit analysis was used to determine IC_{50} of pineapple stem ethanol extract on Oral tongue squamous cell carcinoma cell line. Pearson analysis used to know the correlation between pineapple stem ethanol extract concentration and Oral tongue squamous cell carcinoma cell line apoptosis. The result showed that there was a positive correlation between concentration of pineapple stem ethanol extract and apoptotic cell ($r=0,999$, $p < 0,05$). In conclusion, pineapple stem ethanol extract treatment induced apoptosis of oral tongue squamous cell carcinoma and the increases of pineapple stem ethanol extract concentration followed by the increase of apoptosis induction.

Keyword: oral tongue squamous cell carcinoma, pineapple stem ethanol extract, apoptosis

PENDAHULUAN

Kanker merupakan masalah kesehatan utama di dunia dengan angka kematian yang tinggi. Pada tahun 2005, Angka kematian karena penyakit kanker sebesar 7,6 miliar dari 58 miliar kasus kematian. Berdasarkan prediksi, kematian karena kanker akan meningkat hingga 9 miliar pada 2015 dan akan menjadi 11,4 miliar pada 2030 (WHO, 2008). Angka kematian di Indonesia diperkirakan terdapat 170-190 kasus kanker tiap 100.000 orang (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002).

Kanker leher dan kepala merupakan neoplasma ganas yang terjadi di beberapa lokasi anatomi pada leher dan kepala seperti rongga mulut, telinga, rongga hidung, sinus paranasal, nasofaring, hipofaring, orofaring dan glandula saliva (Cassidy, *et al.*, 2002). Kanker leher dan kepala menempati urutan kesepuluh dari kanker yang paling sering terjadi. Kanker ini juga merupakan penyebab penting morbiditas dan mortalitas di dunia (Adeyemi, *et al.*, 2008).

Enam persen kanker yang terdiagnosis di Amerika Serikat setiap tahun adalah kanker rongga mulut (Alvi, *et al.*, 1996) dan sekitar 3% dari seluruh kanker di dunia (Sakuma, *et al.*, 2006). Lebih dari 90 % kanker rongga mulut merupakan karsinoma sel skuamosa (*Oral Squamous Cell Carcinoma/OSCC*) (Scully, 2003; Bsoul dkk., 2005) dan merupakan keganasan yang paling sering terjadi di rongga mulut (Sakuma dkk., 2006). Karsinoma sel skuamosa sering dideskripsikan sebagai lesi *exophytic*, ulseratif, maupun kombinasi keduanya (Myers, 1996). Beberapa lokasi yang dapat terkena kanker pada rongga mulut antara lain : bibir, mukosa bukal, daerah alveolar atas dan bawah, trigonum retromolar, palatum keras, dasar mulut dan dua pertiga anterior lidah (Alvi, *et al.*, 1996).

***Korespondensi : Hendri Susanto**
Fakultas Kedokteran GIGI,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Email : dgrhendri@ugm.ac.id

Kejadian karsinoma sel skuamosa pada lidah sebesar 40% dari seluruh kejadian karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Lesi kanker pada lidah umumnya dijumpai pada permukaan ventral dan bagian lateral lidah belakang, kedua daerah tersebut dilapisi mukosa non keratinisasi yang lebih tipis sehingga memiliki pertahanan yang lebih kecil terhadap karsinogen (Neville and Day, 2002). Berkembangnya karsinoma sel skuamosa rongga mulut ini dipacu oleh penggunaan tembakau,

alkohol, pola makan, faktor genetik, virus, paparan sinar matahari dan penggunaan obat kumur yang mengandung alkohol (Alvi, *et al.*, 1996).

Pertumbuhan tumor disebabkan adanya ketidakseimbangan antara proliferasi sel dengan kematian sel terprogram atau apoptosis (Baltaziak *et al.*, 2004). Apoptosis dapat diinduksi oleh berbagai cara, termasuk pengobatan dengan glukokortikoid dan sitokin serta kemoterapi, bahkan sekarang telah terbukti bahwa apoptosis dapat terinduksi secara tidak langsung oleh radiasi (*Radiation induced Apoptosis* atau *RIAP*) (Susworo and Putra, 2006). Terapi kanker dengan menginduksi apoptosis kini menjadi strategi baru karena, menurut Gerl and Vaux (2005), tujuan terapi kanker adalah membunuh sel kanker tanpa menyebabkan kerusakan pada sel normal.

Perawatan pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut saat ini, terutama dilakukan dengan pembedahan, radioterapi, dan kombinasi (Scully, 2003) namun untuk tahap lanjut seringkali dibutuhkan pendekatan multifaktor termasuk menggunakan bahan kemoterapi (Shibuya *et al.*, 2004). Sementara untuk kasus pada rongga mulut yang umumnya tidak dapat dilakukan eksisi secara per-oral karena ukurannya yang kecil (< 2cm) dan lokasinya yang sulit dijangkau (Alvi *et al.*, 1996). Sedangkan untuk radioterapi, berdasarkan hasil penelitian Amemiya, *et al.*, (2005), memiliki resiko timbulnya kanker sekunder pada perawatan karsinoma sel skuamosa daerah kepala dan leher. Oleh sebab itu dibutuhkan alternatif pengobatan yang lebih aman.

Beberapa bahan alami seperti teh hijau, ginseng, bawang putih, temulawak (curcumin) dan nanas yang telah dikenal luas memiliki khasiat sebagai antikanker (Boik, 2001). Bahan-bahan tersebut mampu mengaktifasi *death signal* dan menginduksi apoptosis pada sel kanker dan prekanker melalui berbagai jalur (Sarkar dan Li, 2008). Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) adalah buah tropis dengan daging buah berwarna kuning (Kurniawan, 2008) yang telah lama digunakan sebagai tanaman obat oleh beberapa kebudayaan lokal (Kelly, 1996). Nanas memiliki kandungan air 90% dan kaya akan kalium, kalsium, iodium, sulfur dan khlor. Selain itu juga kaya asam, biotin, vitamin B12, vitamin E, serta enzim bromelain (Kurniawan, 2008). Bromelain dikenal secara kimia sejak tahun 1876 dan mulai diperkenalkan sebagai bahan terapeutik saat ditemukan konsentrasinya yang tinggi pada bonggol nanas tahun 1957 (Kelly, 1996). Bromelain, yang diperoleh dari ekstrak mentah dari tanaman nanas (*Ananas comosus* (L.)

Merr), mengandung beberapa jenis proteinase (Tochi, *et al.*, 2008). Bromelain memiliki aksi terapeutik antara lain sebagai penghambat agregasi platelet, memiliki aktivitas fibrinolisis, antiinflamasi, antitumor, modulasi sitokin dan imunitas, sifat pembersihan kulit, meningkatkan absorpsi obat lain, sifat mukolitik, membantu proses pencernaan, mempercepat penyembuhan luka dan mampu meningkatkan kondisi kardiovaskular serta sistem sirkulasi (Kelly, 1996).

Pada perawatan kanker, bromelain dilaporkan mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi sel tumor (Mynott, *et al.*, 1999; Maurer, 2001). Pada perlakuan dengan bromelain terjadi penurunan viabilitas biakan sel melanoma tikus *in vitro* (Guimaraes-Ferreira, *et al.*, 2007). Penelitian *in vitro* lainnya menunjukkan kemampuan bromelain untuk mengurangi kemampuan sel untuk migrasi dan invasi pada sel glioma (Tysnes, *et al.*, 2001) dan penurunan metastasis pada kanker paru-paru Lewis (Batkin, *et al.*, 1988). Pada penelitian *in vivo*, efek penghambatan tumor pada papiloma kulit tikus yang diinduksi menggunakan bahan kimia [7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) dan 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)] menunjukkan efek penghambatan proses tumorigenesis melalui induksi *p53*, pengaturan rasio *Bax/Bcl-2*, induksi *cysteine-containing aspartate-directed proteases/caspase*, menurunkan ekspresi *Cox-2* dan penghambatan jalur *nuclear factor-kappa B (NFkB)* dengan mengatur jalur *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* and *Akt/Protein kinase B (PKB)* (Kalra, *et al.*, 2008). Kejadian resistensi terhadap apoptosis umumnya terjadi karena hilangnya fungsi *p53* sebagai *tumor suppressor gene* (Hanahan dan Weinberg, 2000). Bromelain secara sistemis berfungsi sebagai immunomodulator yang memperbaiki aktivitas immunositotoksitas dari monosit untuk melawan sel kanker (Gerard, 1974 *cit.* Kelly, 1996). Kemampuan induksi sitokin ini menjelaskan kemampuan antitumor dari konsumsi enzim peroral termasuk bromelain (Kelly, 1996). Selain itu, pemberian bromelain bersamaan dengan obat kemoterapi seperti *5-fluorouracil* dan *vincristine*, dapat menurunkan volume tumor (Gerard, 1974 *cit.* Kelly, 1996).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas terhadap apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah.

METODOLOGI

Determinasi bonggol nanas.

Jenis nanas yang dipilih adalah nanas

Palembang. Pada bonggol nanas yang telah diperoleh dilakukan determinasi di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Pembuatan ekstrak bonggol nanas

Bonggol nanas yang sudah dihilangkan daging buahnya dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 45 °C selama 48 jam. Bonggol nanas yang sudah kering dijadikan serbuk. Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk simplisia bonggol nanas dalam etanol 96% selama 24 jam, disaring dan diulang 3 kali. Selanjutnya ampas dan filtrat dipisahkan. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pemanas *waterbath* suhu 70 °C. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental.

Pengaktifan biakan karsinoma sel skuamosa lidah

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, lalu dicairkan dalam *water bath* suhu 37 °C sampai mencair, kemudian disemprot alkohol 70%. Sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang berisi 10 mL medium DMEM-serum (DMEM ditambah FBS 10%, penisilinstreptomisin 3% dan fungizon 1%) dalam ruang *luminary airflow* dan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah dengan DMEM-serum. Setelah didiamkan 20 menit, sel disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, disisakan 1 mL untuk resuspensi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam TCF (*Tissue Culture Flask*) dengan media penumbuh yang mengandung FBS 20% dan dilihat di bawah *inverted microscope*. 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 karsinoma sel skuamosa lidah

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*), sel dapat dipanen untuk kemudian disentrifus pada 2000 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang dan disisakan sekitar 1 mL untuk suspensi ulang pelet. Setelah suspensi sel homogen, tambahkan media penumbuh yang mengandung FBS 10%, kemudian sel kanker didistribusikan menjadi beberapa TCF. Dalam *laminary airflow*, media lama dibuang lalu

sel yang melekat diberi media baru. Suspensi sel yang didapat dibagikan menjadi beberapa *flask*, disimpan dalam inkubator pada suhu 37 °C dan CO₂ 5%.

Pembuatan larutan senyawa uji dan kontrol

Ekstrak etanol bonggol nanas sebanyak 100 mg dilarutkan dalam DMSO sampai 100 µL, kemudian ditambah media (DMEM) hingga konsentrasi 1 mL (konsentrasi larutan stok ekstrak etanol bonggol nanas 100 mg/mL). Sedangkan untuk cisplatin, telah dalam bentuk larutan konsentrasi 1 mg/mL. Stok disimpan sebagai larutan stok dan digunakan dengan diencerkan sesuai kebutuhan.

Uji sitotoksitas

Penelitian dilakukan dengan menggunakan *microplate 96 well* sel kanker sebanyak 2x10⁴ sel/*well* dengan volume 100 µL/*well*. Berbagai konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas ditambahkan pada sumuran tertentu dengan ketentuan sebagai berikut : ekstrak etanol bonggol nanas, dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 mg/mL dan DMEM (kontrol negatif).

Sel yang telah diberi perlakuan dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37 °C and CO₂ 5%. Penghitungan jumlah biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia pada jam ke 0 adalah jumlah sel yang dimasukkan ke dalam tiap sumuran (2x10⁴ sel). Penghitungan kemudian dilakukan kembali pada jam ke 24.

Sebelum penghitungan jumlah biakan sel karsinoma skuamosa lidah, media pada tiap sumuran diambil sebanyak 100 µL. Untuk melepaskan sel kanker hidup yang menempel di dasar sumuran diberikan tripsin sebanyak 50 µL. *Tryphan blue* sebanyak 50 µL ditambahkan dalam tiap *well* lalu ditunggu beberapa menit, kemudian bilik hitung pada *hemocytometer* diisi. Dilakukan penghitungan jumlah sel hidup pada mikroskop dengan perbesaran 10x. Sel yang hidup tampak bening dan tidak menyerap warna biru, sedangkan sel mati berwarna biru karena menyerap *tryphan blue*. Uji sitotoksitas yang sama dilakukan dengan cisplatin sebagai kontrol positif. Perhitungan dilakukan dengan 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT). Sel yang telah diberi perlakuan dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37 °C dan CO₂ 5%. Penghitungan kemudian dilakukan pada jam ke 24. Sebelum perhitungan, pada masing-masing sumuran dimasukkan 25 µL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl-tetrazoliumbromide (MTT) dengan konsentrasi 5 mg/ml, kemudian diinkubasikan selama 4 jam. Sampel dimasukkan ke dalam bio-rad *Microplate* reader dan dihitung dengan panjang gelombang 540

nm. Sel yang mengalami penurunan proliferasi ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang menurun. Sel yang mengalami peningkatan proliferasi ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang meningkat.

IC₅₀

Nilai IC₅₀ nantinya akan dijadikan dasar konsentrasi yang akan digunakan pada uji apoptosis. Digunakan analisis *probit* untuk mencari konsentrasi yang mampu membunuh 50% sampel (Inhibitory Concentration 50). Analisis probit digunakan untuk menguji tingkat konsentrasi terhadap respon sampel (kematian sel)

Uji Apoptosis Skuamos Sel Karsinoma Lidah

Larutan *ethidium bromide - acridine orange* dibuat dengan membuat larutan stok, terdiri dari 50 mg *ethidium bromide* dan 15 mg *acridine orange*, yang dilarutkan dalam 1 mL etanol 95%, kemudian ditambahkan 49 mL akuades. Dari larutan stok, diambil 1 mL dan diencerkan dalam PBS (1:100)

Microplate diinkubasi dengan inkubator dengan suhu 37 °C dan CO₂ 5%. Setelah 24 jam, cairan di dalam *well* dibuang, lalu *coverslip* diambil dan diletakkan pada gelas objek. Kombinasi larutan *ethidium bromide - acridine orange* sebanyak 5-10 µL diteteskan pada *coverslip*. Preparat diamati dengan mikroskop flouresense dengan perbesaran 100-400x. Nukleus sel utuh yang berwarna hijau terang adalah sel yang viabel/hidup dan nukleus sel yang berwarna orange dengan kondensasi kromatin adalah sel yang mengalami apoptosis lanjut. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung pada tiga lapang pandang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya hambatan pertumbuhan biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia oleh ekstrak etanol bonggol nanas dalam berbagai konsentrasi. Hasil uji sitotoksitas ini dipergunakan untuk memperoleh nilai *Inhibitory Concentration 50* (IC₅₀) ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap persentase kematian sel karsinoma skuamosa lidah manusia. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan menggunakan uji analisis probit.

Analisis probit dilakukan untuk mengetahui tingkat konsentrasi bahan (Ekstrak Etanol Bonggol Nanas dan Cisplatin) terhadap respon sampel (persentase kematian sel). Pada penelitian ini yang dicari adalah nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan

melihat nilai probit 0,500 pada tabel hasil uji analisis probit. Nilai IC_{50} disajikan pada Tabel I.

Pada Tabel I dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanol bonggol nanas terhadap persentase kematian biakan sel *SP-C1* adalah sebesar 6.324,49 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai IC_{50} cisplatin terhadap persentase kematian biakan sel *SP-C1* adalah sebesar 33,68 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} yang diperoleh akan menjadi dasar konsentrasi uji apoptosis. Konsentrasi yang digunakan pada uji apoptosis adalah 3 konsentrasi dibawah konsentrasi IC_{50} tersebut.

Uji Apoptosis dengan pewarnaan *Ethidium Bromide* dan *Acridine Orange*

Uji apoptosis dilakukan pada biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dengan menggunakan ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin sesudah inkubasi selama 24 jam menggunakan pewarnaan dengan fluorokrom *ethidium bromide* dan *acridine orange*. Sel yang telah diinkubasi dibuat preparat pada *glass object* kemudian ditetesi fluorokrom dan diamati dibawah mikroskop *fluoresence*.

Pengamatan preparat pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas, cisplatin dan kontrol negatif dilakukan pada tiga lapang pandang yang berbeda (Gambar 1). Sel yang viabel/hidup berwarna hijau (panah putih), sedangkan sel yang mengalami apoptosis nukleus sel mengalami kondensasi kromatin dan berwarna kuning hingga oranye (panah biru).

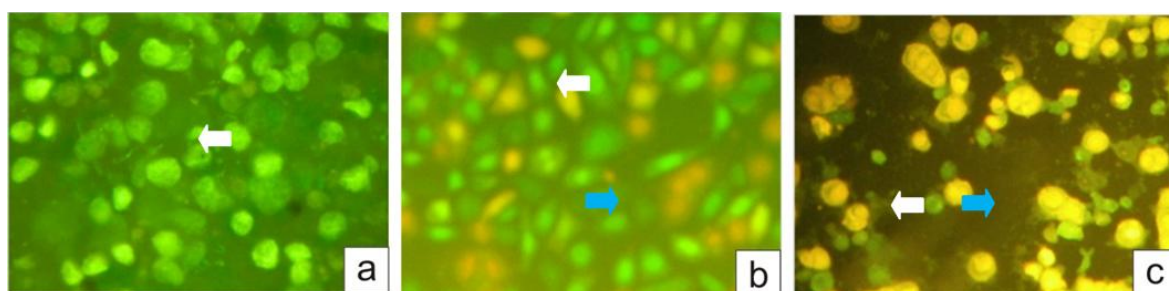
Perhitungan dilakukan untuk menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel total dalam setiap lapang pandang. Hasil perhitungan kemudian dijadikan persentase apoptosis sel. Hasil perhitungan persentase apoptosis terhadap konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin disajikan dalam Tabel II.

Persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas (Gambar 2) dan peningkatan konsentrasi cisplatin (Gambar 3). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas yang diberikan, semakin besar persentase apoptosis yang terjadi. Konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas yang paling besar menyebabkan apoptosis (98%) adalah 6.000 $\mu\text{g/mL}$, sementara itu pada konsentrasi 5.500 $\mu\text{g/mL}$ rata-rata persentase apoptosis yang terjadi sebesar 64 %. Rata-rata persentase apoptosis terkecil (30%) terdapat pada kultur sel yang diberi perlakuan dengan ekstrak etanol bonggol nanas konsentrasi 5.000 $\mu\text{g/mL}$. Apoptosis sel tidak dijumpai pada kelompok kontrol negatif (Tabel II). Hal yang sama terjadi pula pada penggunaan cisplatin sebagai kontrol

positif. Konsentrasi cisplatin yang menyebabkan apoptosis terbesar (87%) adalah 20 $\mu\text{g/mL}$, diikuti dengan konsentrasi 15 $\mu\text{g/mL}$ (76 %) dan terkecil adalah pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ (56%).

Hasil tersebut kemudian dianalisis menggunakan analisis Korelasi *Pearson* (Tabel III). Nilai koefisien korelasi (r) pada Tabel III sebesar 0,999 (ekstrak etanol bonggol nanas) dan 0,969 (cisplatin). Kedua koefisien korelasi bertanda positif menunjukkan adanya korelasi atau hubungan positif (searah) antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap persentase apoptosis karsinoma sel skuamosa rongga mulut, artinya semakin besar konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin, semakin besar persentase apoptosis yang terjadi. Hal tersebut juga tampak pada grafik yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap rerata persentase apoptosis (Gambar 2 dan Gambar 3). Nilai koefisien korelasi besarnya antara 0,801 hingga 1,000 maka hubungan korelasi keduanya sangat kuat.

Nilai probabilitas (p) pada Tabel I sebesar 0,000 (perlakuan ekstrak etanol bonggol nanas maupun cisplatin). Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($p < 0,05$). Hal ini berarti terdapat korelasi yang bermakna atau hubungan signifikan



Gambar 1. Gambaran biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia pasca uji apoptosis. (a) kontrol negatif, (b) ekstrak etanol bonggol nanas (5500µg/mL), (c) cisplatin (10µg/mL).

Tabel I. Hasil Analisis Probit (IC₅₀) Persentase kematian Sel SP-C1 terhadap Konsentrasi

Bahan	NO	Konsentrasi (dalam µg/mL)	Rata-rata Persentase kematian sel	IC ₅₀ (dalam µg/mL)
Ekstrak Etanol Bonggol Nanas	1	1.000	9,39	6.324,49
	2	2.000	26,63	
	3	3.000	30,68	
	4	4.000	36,28	
	5	5.000	37,28	
	6	6.000	47,11	
	7	7.000	57,49	
	8	8.000	59,93	
	9	9.000	71,03	
	10	10.000	77,44	
Cisplatin	1	6.25	8,27	33,68
	2	12.5	36,57	
	3	25	43,64	
	4	50	58,50	
	5	100	72,89	
Kontrol		0	0	-

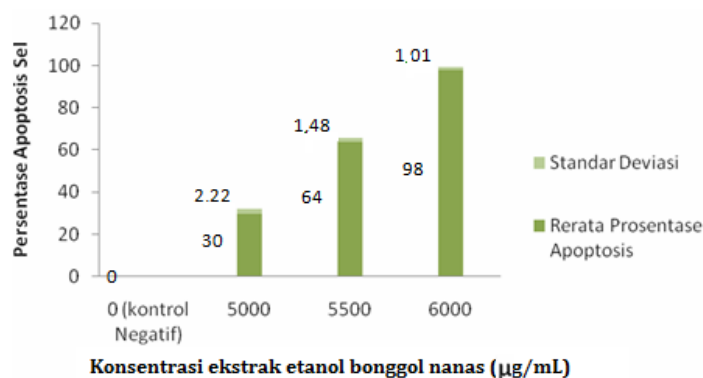
Tabel II. Persentase Apoptosis Sel terhadap Konsentrasi Ekstrak Etanol Bonggol Nanas dan Cisplatin

Bahan	NO	Konsentrasi (µg/mL)	Rerata Persentase Apoptosis ± SD (dalam %)
Ekstrak Etanol Bonggol Nanas	1	5.000	30 ± 2,22
	2	5.500	64 ± 1,48
	3	6.000	98 ± 1,01
	4	0 (Kontrol)	0
Cisplatin	1	10	56 ± 2,40
	2	15	76 ± 2,96
	3	20	87 ± 3,11
	4	0 (Kontrol)	0

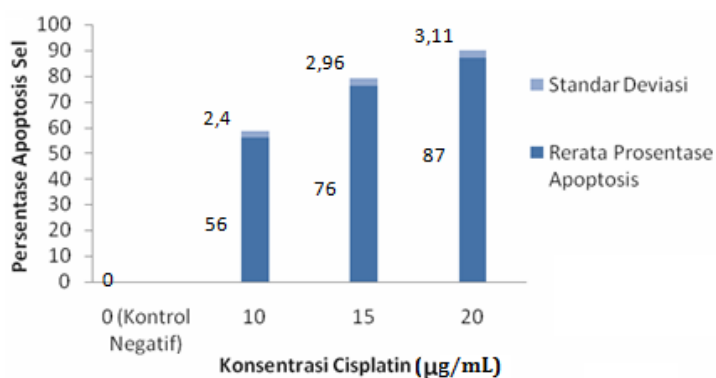
antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia pada taraf kepercayaan 95 %.

Setelah uji hipotesis dengan korelasi - Pearson, digunakan analisis regresi sederhana

untuk memprediksi nilai suatu variabel terpengaruh, yaitu persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia, berdasarkan nilai variabel pengaruh, yaitu konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas. Hasil analisis regresi sederhana dapat dilihat pada tabel IV.



Gambar 2. Grafik rerata persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia setelah perlakuan dengan ekstrak etanol bonggol nanas.



Gambar 3. Grafik rerata persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia setelah perlakuan dengan cisplatin.

Nilai probabilitas yang diperoleh kurang dari 0,05, hal ini berarti rumus regresi memenuhi syarat untuk dipenuhi. Nilai R (r kuadrat) menunjukkan besarnya persentase prediktor (Konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas) terhadap variabel terpengaruh (Persentase apoptosis). Dari hasil analisis regresi 99,7% apoptosis disebabkan oleh ekstrak etanol bonggol nanas, 0,3% sisanya oleh faktor lain. Pada cisplatin pengaruh pemberian cisplatin adalah 93,1%, sisanya sebesar 6,9% oleh faktor lain.

Pembahasan

Ekstrak etanol bonggol nanas memiliki efek sitotoksitas terhadap biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dengan nilai IC_{50} 6.324,49 µg/mL. Nilai IC_{50} ini jauh lebih besar dibanding IC_{50} cisplatin, yaitu 33,68 µg/mL. Hal ini dikarenakan enzim bromelain pada ekstrak etanol bonggol nanas memiliki sifat toksisitas yang kecil (Kelly, 1996) sedangkan cisplatin, seperti halnya obat kemoterapi yang lain, merupakan obat yang

bersifat sitotoksik (Barrasch dkk., 1998). Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui penghambatan biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia terhadap ekstrak etanol bonggol nanas. Kanker umumnya terjadi karena adanya peningkatan proliferasi sel dan penurunan kemampuan apoptosis (Ponder, 2001; Gerl dan Vaux, 2005). Pada penelitian-penelitian sebelumnya, bromelain dari ekstrak bonggol nanas mampu menghambat pertumbuhan tumor melalui perhambatan proliferasi sel tumor (Mynott dkk., 1999; Maurer, 2001) dan apoptosis (Kalra dkk., 2008; Chobotova dkk., 2009). Dari uraian diatas, efek penghambatan ekstrak etanol bonggol nanas terhadap biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia ini dapat berupa penurunan proliferasi sel (anti proliferasi) maupun induksi apoptosis.

Efek sitotoksik ekstrak etanol bonggol nanas terhadap biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia, menurut hasil penelitian ini, dapat juga menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Penyimpangan terhadap apoptosis ini merupakan salah satu penyebab kanker (Elrod dan

Tabel III. Hasil korelasi *pearson* konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap apoptosis sel SP-C1

Korelasi Pearson	r	p
Konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dengan persentase apoptosis sel	0,999	0,000(*)
Konsentrasi cisplatin dengan persentase apoptosis sel	0,969	0,000(*)

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

Tabel IV. Hasil uji analisis regresi sederhana antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan cisplatin terhadap persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia

Kelompok	r	R (r kuadrat)	p
Persentase apoptosis sel terhadap Ekstrak Etanol Bonggol Nanas	0,999	0,997	0,000(*)
Persentase apoptosis sel terhadap Cisplatin	0,969	0,931	0,000(*)

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

Sun, 2008), sehingga banyak dilakukan pengembangan bahan baru yang mampu menginduksi apoptosis pada berbagai tahapan siklus sel (Spencer dkk., 2002) termasuk menggunakan ekstrak etanol bonggol nanas.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bonggol nanas menginduksi apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia. Sel yang telah diberi perlakuan ekstrak etanol bonggol nanas, kemudian dicat dengan fluorokrom *ethidium bromide* dan *acridine orange*, serta diamati di bawah mikroskop *fluorescence* untuk konfirmasi terjadinya apoptosis. *Acridine orange* bersifat permeabel sehingga dapat memasuki sel sehat maupun sel yang mati. *Ethidium bromide* hanya dapat memasuki sel mati pada membran sel yang rusak (Kusnetsov dkk., 2004). Pada sel yang mengalami apoptosis terjadi perubahan morfologis antara lain : terjadi fragmentasi DNA, penurunan volume sel, hilangnya fungsi mitokondria, *membrane blebbing* dan pembentukan *apoptotic bodies* (Ross dkk., 2003). *Ethidium bromide - acridine orange* memiliki kemampuan untuk mewarnai nukleus pada tahap akhir apoptosis menjadi berwarna kuning-oranye (Buomino dkk., 1999). Pada penelitian ini, biakan karsinoma skuamosa lidah manusia menunjukkan adanya apoptosis karena menunjukkan gambaran morfologis berupa nukleus yang tidak utuh dan tercatat berwarna kuning hingga oranye oleh flurkrom *ethidium bromid* pada pengamatan menggunakan mikroskop *fluorescence*.

Hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak etanol bonggol nanas mampu meningkatkan apoptosis. Berdasarkan uji korelasi Pearson (Tabel III) dan grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan persentase apoptosis (Gambar 2) menunjukkan

bahwa terjadi peningkatan apoptosis pada biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas. Hasil ini sesuai dengan kontrol positif yang digunakan yaitu cisplatin yang menunjukkan korelasi positif antara konsentrasi cisplatin terhadap persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia. Cisplatin merupakan salah satu bahan kemoterapi yang telah banyak digunakan untuk berbagai macam kanker (Shibuya dkk., 2004). Pada penelitian Supriatno (2008), cisplatin mampu menghambat pertumbuhan kanker lidah manusia melalui mekanisme induksi apoptosis melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Hasil uji korelasi *pearson* ini menjelaskan bahwa terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dan persentase apoptosis. Hubungan tersebut bernilai positif, sehingga pada peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas akan menyebabkan peningkatan persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah. Hasil ini diperkuat dengan hasil analisis Regresi (Tabel IV) yang menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak etanol bonggol nanas adalah sebesar 99,7% terhadap persentase apoptosis yang terjadi. Pada penelitian ini, peningkatan persentase apoptosis yang terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas yang digunakan, disebabkan karena konsentrasi yang digunakan adalah tiga konsentrasi dibawah IC_{50} sehingga masih dibawah potensi sitotoksitas ekstrak etanol bonggol nanas.

Apoptosis dapat terjadi karena adanya sinyal dari dalam maupun dari luar sel (Elrod dan Sun, 2008). Pada penelitian ini, sinyal penyebab apoptosis adalah sinyal dari luar sel dengan perlakuan menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas. Kemampuan induksi

apoptosis ekstrak etanol bonggol nanas kemungkinan disebabkan adanya kandungan enzim bromelain di dalamnya (Kurniawan, 2008; Tochi, 2008). Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penelitian Maurer (2001) yang menyatakan bromelain mampu menghambat proliferasi dan diferensiasi sel tumor *in vitro* pada sel leukemia melalui mekanisme apoptosis. Menurut Kalra (2008) apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia karena enzim bromelain dapat terjadi melalui jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik karena mampu meningkatkan pengaturan p53, bax, caspase 3 dan caspase 9, serta menurunkan protein anti apoptosis bcl2. Apoptosis melalui jalur intrinsik umumnya diawali aktivasi anggota pro apoptosis *Bcl-2 family*, yaitu *Bax* dan *Bak*, yang memfasilitasi terlepasnya *cytochrome c* dari mitokondria yang kemudian mengaktifkan *caspase-9* (Fan dkk., 2005). Aktivasi *p53* dapat menyebabkan apoptosis maupun terhentinya siklus sel. Salah satu target *p53* adalah *Bax*, yang ekspresinya secara langsung terinduksi oleh pengikatan protein *p53* pada *sequence* diantara promoter. Induksi ekspresi *Bax* akan menurunkan ekspresi *Bcl-2*, mengubah rasio *Bax/Bcl-2* dan memulai aktivitas apoptosis (Archer dkk., 2000). Jalur ekstrinsik dimulai dengan pengikatan *death receptor* membentuk *Death Induced Signalling Complex (DISC)* yang akan mengaktifkan caspase 8 dan menginduksi *effector caspase* yaitu *casapase 3* dan *caspase 7* (Elrod dan Sun, 2008). Pada penelitian ini, hanya menunjukkan adanya perubahan morfologis pada apoptosis yang dideteksi dengan metode *ethidium bromide* dan *acridine orange*. Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak bonggol nanas yang diberikan pada biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia mampu menginduksi apoptosis.

KESIMPULAN

Terdapat pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas terhadap apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia. Terdapat hubungan positif konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas dengan persentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia

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., 1996, *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, 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.
- Archer, C., Trott, P., dan Dowsett, M., 2000, *Apoptosis Pathways*, dalam Bronchud M. H., dalam : Foote M., Peters W. P., Robinson M. O. (eds.), *Principles of Molecular Oncology*, Humana Press, New Jersey, h 237-255.
- Baltaziak, M., Koda, M., Barwijuk-Machala, M., Musiatowicz, B., Duraj, E., Kanczuga-Koda, L., Musiatowicz, M., dan Reszee J., 2004, The Role of Bak Expression in Apoptosis of the Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and Metastases to Lymph Nodes (LNs), *Annal Acad Med Biol*, 49 (Suppl. 1): 14-15.
- 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.
- Batkin, S., Taussig, S., dan Szeckerczes, J., 1988, Antimetastatic Effect of Bromelain with or without Its Proteolytic and Anticoagulant Activity, *J. Can. Res. Clin. Oncol*, 114:507-508.
- 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. Contemp. Dent. Practice*, 6(4) : 001-016.
- Cassidy J., Bissett D., dan Spence R. A. J., 2002, *Oxford Handbook of Oncology*, Oxford University Press: New York.
- Chobotova, K., Vernallis, A. B., Majid, F. A. A., 2009, Bromelain's Activity and Potential As An Anti-Cancer Agent: Current Evidence and Perspectives, *Cancer Lett.*, doi:10.1016/j.canlet.2009.08.001
- Elrod, H. A. dan Sun S. Y., 2008, PPAR γ and Apoptosis in Cancer, *PPAR Research*, 1-7.
- Fan, T., Han, L., Cong, R., dan Liang, J., 2005, Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochem Biophys Sin*, 37(11) : 719-727
- Gerl, R. dan Vaux, D. L., 2005, Apoptosis in the Development and Treatment of Cancer, *Carcinogenesis*, 26(2): 263-270.
- Guimaraes-Ferreira, C. A., Rodrigues, E. G., Mortara, R. A., Cabral, H., Serrano, F. A., Ribeiro-dos-Santos, R., dan Travassos, R. L., 2007, Antitumor Effects In Vitro and In Vivo and Mechanisms of Protection against Melanoma B16F10-Nex2 Cells By Fastuosain, a Cysteine Proteinase from

- Bromelia fastuosa*, *Neoplasia*, 9 (9): 723-733. www.neoplasia.com, 12/07/09
- Hanahan, D. dan Weinberg, R. A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70.
- Kalra, N., Bhui, K., Roy, P., Srivastava, S., George, J., Prasad, S., dan Shukla, Y., 2008, Regulation of p53, Nuclear Factor κB and Cyclooxygenase-2 Expression by Bromelain Through Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Mouse Skin, *Toxicol Appl Pharmacol*, 226: 30-37, www.elsevier.com, 12/07/09.
- Kelly, G. S., 1996, Bromelain : A Literature Review and Discussion of Its Therapeutic Application, *Alternative Medicine Review*, 1 (4) : 243-257.
- Kurniawan, F., 2008, Sari Buah Nanas Kaya Manfaat : Alternatif Meningkatkan Nilai Ekonomis Hasil Panen, Sinar Tani edisi 13-19 Agustus 2008.
- Kuznetsov, G., Towle, M. J., Cheng, H., Kawamura, T., TenDyke, K., Liu, D., Kishi, Y., Yu, M. J., dan Littlefield B. A., 2004, Induction of Morphological and Biochemical Apoptosis following Prolonged Mitotic Blockage by Halichondrin B Macrocytic Ketone Analog E7389, *Cancer Res*, 64: 5760-5766
- Maurer, H. R., 2001, Bromelain : Biochemistry, Pharmacology and Medical Use, *Cell Mol Life Sci*, 58: 1234-1245.
- Myers, J. N., 1996, *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.
- Mynott, T. L., Ladhams, A., Scarmato, dan P., Engwerda, C. R., 1999, Bromelain, from Pineapple Stems, Proteolytically Blocks Activation of Extracellular Regulated Kinase-2 in T Cells, *J Immunol*, 163: 2568-2575.
- Neville, B. W., dan Day, T. A., 2002, Oral Cancer and Precancerous Lesions, *CA Cancer J. Clin.*, 52: 195-215, <http://caonline.amcancersoc.org>, 10/07/2009.
- Ponder, B.A. J., 2001, Cancer Genetics, *Nature*, 411: 336-341, www.nature.com, 10/07/2009.
- Ross, M. H., Kaye, G. I., dan Pawlina, W., 2003, *Histology A Text and Atlas : with Cell and Molecular Biology*, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, h.73-74.
- 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.
- Sarkar, F. H., dan Li, Y., 2008, Cell Signaling Pathways Altered by Natural Chemopreventive Agents, *Mutation Res*, 555: 53-64
- 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
- Spencer, K. R., Ferguson, J.W., dan Wiesenfeld, D., 2002, Current Concepts in the Management of Oral Squamous Cell Carcinoma, *Aus Dent J*, 47 (4):284-289
- Supriatno, 2008, Cis-platinum Meningkatkan Apoptosis dan Hambatan Invasi Sel Kanker Lidah Manusia *in vitro*, *MIKGI*, 10 (1) : 75-78.
- Tjindarbunmi, D. dan Mangunkusumo, R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn. J. Clin. Oncol*, 32 (Suplement 1) : S17-S21.
- Tochi, B. N., Wang, Z., Ying Xu, S., dan Zhang, W., 2008, Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain) : A Review, *Pakistan J Nutr*, 7 (4) : 513-520
- Tysnes, B. B., Maurer, H.R., Porwol, T., Probst, B., Bjerkvig, R., dan Hoover, F., 2001, Bromelain Reversibly Inhibits Invasive Properties of Glioma Cells, *Neoplasia*, 3(6): 469-479.
- World Health Organization, 2008, *Cancer*, www.who.int/cancer/en/, 27/10/2008