

PEMANFAATAN EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH DELIMA SEBAGAI ANTI KANKER LIDAH SP-C1

Mahmud Kholifa

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email : mahmudkholifa@yahoo.com

ABSTRACT

Tongue cancer has invasion characteristic and metastatic that high to regional lymph nodes or distant. Cancer treatment is categorized as a disease that difficult to cure despite a holistic therapy, are still at risk of secondary cancers arise, so a new strategy is needed to use cheaper and safer materials namely herbal ingredients, one of which with ethanol extract of pomegranate seeds. The purpose of this study was to test ability concentration of ethanol extract of pomegranate seeds as anti-cancer and determine the appropriate dosage for humans. The method used with detect cells undergoing apoptosis with staining ethidium bromide and acridine orange and measure the diameter of cancers in nude mice after treatment with ethanol extract of pomegranate seeds. Results are expected for the first year of the discovery of new anti-cancer from herbal ingredients, especially ethanol extract of pomegranate seeds. While the outcome for the second year was the discovery of anti-cancer dose corresponding to a human from the ethanol extract of pomegranate seeds. In conclusion, the concentration of ethanol extract of pomegranate seeds influential as an anti - cancer on cultured human tongue squamous cell carcinoma and the increases of concentration of ethanol extract of pomegranate seeds followed by the increases of percentage apoptosis on cultured human tongue squamous cell carcinoma.

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

PENDAHULUAN

Kanker adalah pertumbuhan jaringan yang tidak terkontrol pada individu yang rentan, akibat terjadinya ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis (Ponder, 2001). Kanker merupakan istilah untuk proses neoplasma maligna (Pitot, 2002), yang terjadi akibat adanya gangguan mekanisme normal yang mengatur keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis (Myers, 1996). Kanker lidah merupakan keganasan yang paling sering terjadi di rongga mulut (Sakuma dkk., 2006).

Pada penelitian ini karsinoma sel skuamosa lidah yang dibiakkan dari sel kanker lidah manusia di beri perlakuan dengan ekstrak etanol biji buah delima yang mengandung flavonoid dan bersifat antioksidan. Hasil yang diharapkan pada penelitian ini berupa analisis ekstrak etanol biji buah delima yang diberikan bisa menyebabkan apoptosis sel kanker lidah.

Metode

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah karsinoma sel skuamosa lidah manusia yang di biakan dari karsinoma sel skuamosa lidah manusia dengan deferensiasi sedang dan belum menginvasi ke jaringan otot. Tahap yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pengaktifan biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia, pembiakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia, aplikasi ekstrak etanol biji buah delima kemudian dilanjutkan pengecatan dengan kombinasi larutan *Ethidium bromide* dan *acridine orange* sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop fluoresensi untuk menghitung persentase sel yang mengalami apoptosis.

Pengaktifan biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dilakukan dengan mengambil biakan sel dari tangki nitrogen cair, kemudian dimasukkan dalam *water bath* pada suhu 37 °C sampai mencair. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung sentrifus yang sudah diberi media RPMI – serum sebanyak 10 ml ditambah antibiotik dan

anti jamur (PBS 10%, Penisilin – Stretomisin 3% dan Fungizon 1%), lalu di sentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terjadi dibuang, endapan yang terbentuk di beri media RPMI – serum, didiamkan 20 menit, lalu sel disentrifus lagi. Supernatan di sisakan 1 ml untuk resuspensi, dimasukkan ke dalam TCF (*Tissue Culture Flask*) yang sudah diberi media penumbuh yang mengandung (FBS) 20% selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C dan CO2 5% .

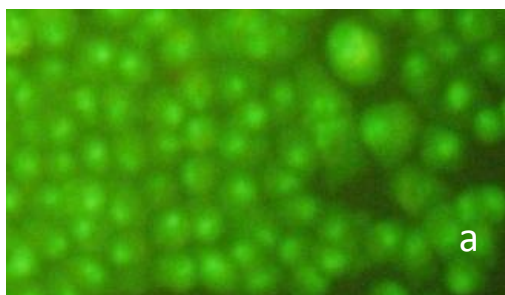
Pembiakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dilakukan dengan mengambil biakan sel dari stock, dibiakan dalam cawan petri yang di beri media RPMI ditambah fetal calf serum 10% , streptomisin 100 µg/ml dan penisilin 100 unit/ml, kemudian diinkubasi dengan kelembaban udara 95% dan 5% CO2 pada suhu 37°C. Media diganti dengan media baru setiap 3 hari sekali sampai pertumbuhan konfluen selanjutnya dibiakan pada cawan petri baru sampai dengan *passage* ke lima, kemudian dipanen dan disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatant disisakan 1 ml untuk suspensi dan tambahkan media penumbuh yang mengandung FBS 10%, kemudian didistribusikan menjadi beberapa TCF. Dalam *laminary air flow*, media lama dibuang lalu sel

yang melekat diberi media baru dan dibagi menjadi beberapa *flask*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dan CO2 5% selama 5 menit selanjutnya dipanen dalam *conical tube*.

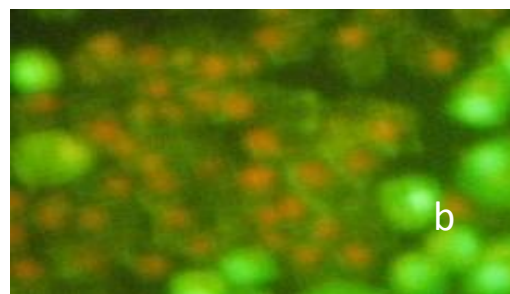
Microplate 32 sumuran yang terdiri dari 4 baris dan 8 kolom, sebelumnya telah diberi *cover glass*, yang diletakkan pada dasar sumuran, diisi dengan 3 ml media RPMI , kemudian diisi dengan 100 µl sel karsinoma skuamosa lidah selanjutnya di inkubasi pada suhu 37 °C dan CO2 5% selama 24 jam. Setelah 24 jam, semua cairan dibuang , pada kolom 1 sebagai kontrol kemudian dari kolom 2-8 secara berurutan ditambahkan 5 ml ekstrak etanol biji delima dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250µg/ml, selanjutnya di inkubasi pada suhu 37 °C dan CO25% selama 48 jam. Setelah 48 jam, *coverglass* diambil dan diletakkan pada gelas obyek lalu ditetesi 5-10µl larutan *Ethidium Bromide* dan *acridine orange* selanjutnya diamati dengan mikroskop fluoresense dengan pembesaran 100 - 400 x. Sel yang mengalami apoptosis akan tercatat kuning, selanjutnya persen apoptosis di dapat dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dalam 100 sel

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi sel dengan metode pewarnaan *Ethidium Bromide* dan *Acridine Orange* dapat di lihat pada gambar 1a dan 1b.



Gambar 1a. Kelompok kontrol, sel yang hidup berwarna hijau.



Gambar 1b. sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak ethanol biji delima mengalami apoptosis berwarna kuning.

Hasil perhitungan persentase apoptosis dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dalam 100 sel, disajikan dalam Tabel I berikut ini :

Tabel I. Persentase apoptosis sel terhadap konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima

Bahan	No	Konsentrasi (µg/ml)	Rerata Persentase Apoptosis ± SD (dalam %)
	1	0(Kontrol)	0
	2	25	12 ± 1,83
	3	50	17 ± 2,22
Ekstrak	4	75	27 ± 1,29
Etanol Biji	5	100	42 ± 0,96
Delima	6	150	54 ± 1,29
	7	200	60 ± 2,71
	8	250	70 ± 2,06

Kenaikan konsentrasi ekstrak ethanol biji delima yang diberikan di ikuti oleh kenaikan persentase apoptosis. Rata-rata persentase apoptosis yang paling besar adalah 70% yang dihasilkan oleh konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima 250 µg/ml, sedangkan rata-rata persentase apoptosis yang paling kecil adalah terjadi 22% yang dihasilkan oleh konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima 25 µg/ml. Pada kelompok kontrol tidak terjadi apoptosis sel.

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. Hasil Uji Normalitas Data

Materi Uji	Konsentrasi	P
	25	.714(*)

Hasil uji persamaan variansi (Tabel III) menunjukkan nilai probabilitas lebih besar dari α ($0,220 > 0,05$) maka H_0 diterima, kesimpulannya H_0 diterima sehingga varian semua sampel identik yang berarti data homogen atau tidak terdapat perbedaan bermakna variansi antar kelompok, sehingga memenuhi syarat untuk dapat dilakukan analisis

	50	.798(*)
Ekstrak Etanol	75	.972(*)
Biji Delima	100	.272(*)
	150	.972(*)
	200	.062(*)
	250	.161(*)

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 persentase apoptosis memiliki distribusi normal.

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

Tabel III. Hasil uji *Levene test* untuk melihat persamaan variansi

<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	P
1.520	6	21	0,220

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

One Way ANOVA (Tabel IV) dengan hipotesis H_0 : Rata-rata persentase apoptosis identik, H_a : Rata-rata persentase apoptosis tidak identik dengan $\alpha = 0,05$, daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

(Tabel IV). Hasil analisis ANOVA satu jalur

	Jumlah Kuadrat	db	Rerata Kuadrat	F	p.
Antar Kelompok	11803,857	6	1967,310	571,813	0,000(*)
Dalam Kelompok	72,250	21	3,440		
Total	11876,107	27			

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 persentase apoptosis tidak identik yang berarti terdapat perbedaan bermakna rata-rata persentase apoptosis dengan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji delima

Setelah mengetahui hasil uji Anova bahwa rata-rata persentase apoptosis tersebut berbeda secara signifikan, maka untuk mengetahui, perbedaan rerata persentase apoptosis kelompok

mana saja yang memiliki nilai berbeda dapat dilakukan lanjut dengan uji Post Hoc (Uji *Least Significance Difference / LSD*), seperti ditampilkan pada tabel V, dengan hipotesis H_0 adalah rata-rata persentase apoptosis $i = j$ dan H_a adalah rata-rata persentase apoptosis $i < j$ dengan keterangan i dan j = kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak etanol biji delima 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$ dengan $\alpha = 0,05$, daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai probabilitasnya $< \alpha$.

Tabel V. Hasil Uji LSD

(I) Konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
25	50	-5.25000*	1.31158	.010	-9.5137	-.9863
	75	-14.50000*	1.31158	.000	-18.7637	-10.2363
	100	-27.75000*	1.31158	.000	-32.0137	-23.4863
	150	-41.50000*	1.31158	.000	-45.7637	-37.2363
	200	-48.00000*	1.31158	.000	-52.2637	-43.7363
	250	-57.75000*	1.31158	.000	-62.0137	-53.4863
50	25	5.25000*	1.31158	.010	.9863	9.5137
	75	-9.25000*	1.31158	.000	-13.5137	-4.9863
	100	-22.50000*	1.31158	.000	-26.7637	-18.2363
	150	-36.25000*	1.31158	.000	-40.5137	-31.9863
	200	-42.75000*	1.31158	.000	-47.0137	-38.4863
	250	-52.50000*	1.31158	.000	-56.7637	-48.2363
75	25	-5.25000*	1.31158	.000	-9.5137	-.9863
	50	-14.50000*	1.31158	.000	-18.7637	-10.2363
	100	-27.75000*	1.31158	.000	-32.0137	-23.4863
	150	-41.50000*	1.31158	.000	-45.7637	-37.2363
	200	-48.00000*	1.31158	.000	-52.2637	-43.7363
	250	-57.75000*	1.31158	.000	-62.0137	-53.4863
100	25	27.75000*	1.31158	.000	23.4863	32.0137
	50	22.50000*	1.31158	.000	18.2363	26.7637
	75	13.25000*	1.31158	.000	8.9863	17.5137
	150	-13.75000*	1.31158	.000	-18.0137	-9.4863
	200	-20.25000*	1.31158	.000	-24.5137	-15.9863

	250	-30.00000*	1.31158	.000	-34.2637	-25.7363
150	25	41.50000*	1.31158	.000	37.2363	45.7637
	50	36.25000*	1.31158	.000	31.9863	40.5137
	75	27.00000*	1.31158	.000	22.7363	31.2637
	100	13.75000*	1.31158	.000	9.4863	18.0137
	200	-6.50000*	1.31158	.001	-10.7637	-2.2363
	250	-16.25000*	1.31158	.000	-20.5137	-11.9863
200	25	48.00000*	1.31158	.000	43.7363	52.2637
	50	-14.50000*	1.31158	.000	38.4863	47.0137
	75	-27.75000*	1.31158	.000	29.2363	37.7637
	100	-41.50000*	1.31158	.000	15.9863	24.5137
	200	-48.00000*	1.31158	.001	2.2363	10.7637
	250	-57.75000*	1.31158	.000	-14.0137	-5.4863
250	25	57.75000*	1.31158	.000	53.4863	62.0137
	50	52.50000*	1.31158	.000	48.2363	56.7637
	75	43.25000*	1.31158	.000	38.9863	47.5137
	100	30.00000*	1.31158	.000	25.7363	34.2637
	200	16.25000*	1.31158	.001	11.9863	20.5137
	250	9.75000*	1.31158	.000	5.4863	14.0137

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

Dari hasil uji *LSD* menunjukkan nilai *p* yang kurang dari 0,05 adalah antara konsentrasi 25 µg/ml dan 50 µg/ml yaitu 0.010, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 50 µg/ml yaitu 0.010, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 75 µg/ml yaitu 0.000, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 100 µg/ml yaitu 0.000, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 150 µg/ml yaitu 0.000, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 200 µg/ml yaitu 0.000, antara konsentrasi 25 µg/ml dan 250 µg/ml yaitu 0.000 demikian juga antara kelompok konsentrasi 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 persentase apoptosis antara semua kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak etanol biji delima tidak identik yang berarti terdapat perbedaan bermakna rata-rata persentase apoptosis antara tiap kelompok perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji delima.

Semakin besar konsentrasi ekstrak ethanol biji delima yang diberikan maka akan semakin besar pula persentase apoptosis yang terjadi. Peningkatan konsentrasi ekstrak ethanol biji delima secara signifikan akan meningkatkan persentase apoptosis sel kanker lidah. Dalam penelitian ini di dapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan ekstrak ethanol biji delima terhadap apoptosis sel kanker lidah manusia. Hal ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya.

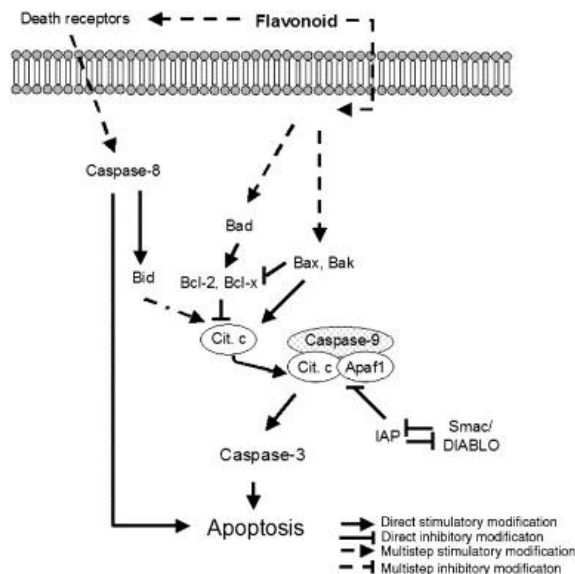
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ramos (2007) pemberian selama 3 hari dengan dosis 20 – 500µmol/L menunjukkan *flavonoids* menginduksi apoptosis pada biakan sel kanker paru, kanker payudara, kanker prostat dan kanker usus. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan Koyama dkk (2010), *Pomegranate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

Terdapat teori yang menyebutkan bahwa delima mempunyai kandungan zat aktif yang tinggi, terdiri dari polifenol, tannin dan anthocyanins yang bersifat sebagai zat antioksidan yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dan memulihkan pengerasan pada dinding arteri. Khususnya di dalam polifenol mengandung 60% *flavonoids* yang dapat menurunkan resiko penyakit kronis termasuk sel kanker dengan target *chemopreventif* menghambat proses karsinogenesis pada tahap permulaan, peningkatan dan perkembangan kanker dengan modulasi proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis,

angiogenesis dan metastasis. *Flavonoids* menginduksi apoptosis dengan meningkatkan komponen proapoptotic (Ramos, 2007). Untuk mengikat kandungan zat aktif tersebut dilakukan ekstraksi dengan etanol. Pemakaian etanol sebagai bahan pengikat zat aktif karena memiliki beberapa kelebihan yaitu lebih selektif, kuman sulit tumbuh pada konsentrasi diatas 20 %, tidak toksis, netral dan absorbsinya baik.

Adanya perbedaan yang bermakna pada penelitian ini mungkin disebabkan tingginya kandungan *Flavonoid* terutama di dalam biji buah delima yang memiliki khasiat terapeutik antara lain anti bakteri, anti virus, antioksidan, dan anti tumor. *Flavonoid* menginduksi apoptosis pada sel kanker melalui jalur intrinsik atau mitokondria. Pada perawatan kanker, flavonoid menghambat proses tomorigenesis melalui induksi *p53*, pengaturan rasio *Bax/Bcl-2*, induksi *caspace*. Kejadian resistensi terhadap apoptosis umumnya terjadi karena hilangnya fungsi *p53* sebagai *tumor suppressor gene* (Hanahan dan Eeinberg, 2000). 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 apoptosis maupun terhentinya siklus sel.

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



Gambar 2. Mekanisme anti tumor oleh Flavonoid.

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

Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

1. Konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima berpengaruh sebagai anti kanker terhadap biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia.
2. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima diikuti oleh peningkatan presentase apoptosis biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia secara signifikan.

Saran

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

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* tentang pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji buah delima sebagai anti kanker lidah

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis ekstrak etanol biji buah delima yang bisa dikonversi untuk manusia.
3. Penelitian ini bisa di manfaatkan untuk menetapkan dosis yang sesuai untuk terapi suportif kanker dari bahan herbal
4. Peran polifenol yang merupakan zat aktif yang berperan sebagai antioksidan perlu diteliti lebih lanjut dengan tehnik yang lebih akurat untuk membuktikan mekanisme apoptosis dalam menurunkan kanker.

Persantunan

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

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 – 13.1
- 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., 2007, Correlation of Clinical, Histological, and Cytokeratin Profiles of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue With Prognosis, *Int J Surg Path*, 15 (4) : 376-383, <http://ijs.sagepub.com>, 12/07/2009.
- Supriatno, 2006, Cepharanthin menghambat Invasi dan Metastasis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut Manusia In Vitro, *Indon J. Dent.* Vol 13/3, pp.181-185.
- 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., 2008, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 32 (Suplement 1) : S17-S21.
- Wiseman, S. M., Swede, H., Stoler, D. L., Anderson, G. R., Rigual, N. R., Hicks, W. L., Douglas, W. G., Tan, D., dan Loree, T. R., 2007, Squamous Cell Carcinoma of The Head and Neck in Nonsmokers and Nondrinkers : An Analysis of Clinicopathologic Characteristics and Treatment Outcomes, *Annals Surg Oncol*, 10(5): 551-557.
- World Health Organization, 2008, *Cancer*, www.who.int/cancer/en/, 27/10/2008.
- Ye, H., Yu, T., Barry, L. Z., Wang, J. G., Joel, L. S., Mao, L., David, T. W., dan Xiaofeng, Z., 2008, Transcriptomic Dissection of Tongue Squamous Cell Carcinoma, *BMC Genomic*, 9 (96) : 1 - 11, [http : // www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com), 08/02/2009.
- Ziober, A. F., Falls, E. M., dan Ziober, B. L., 2006, The Extracellular Matrix in Oral Squamous Cell Carcinoma : Friend or Foe, *Head and Neck*, 28 : 740 -7