

## Pengaruh ekstrak biji melinjo terhadap viabilitas dan apoptosis sel hsc-3

Monica Dewi Ranggaini<sup>1</sup>, Johni Halim<sup>1</sup>, Richard Tridarmawan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

<sup>2</sup>Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

Jl. Kyai Tapa, No. 1, RT.5/RW.9, Tomang, Grogol Petamburan, Jakarta Barat 11440

Telepon: (021) 5655786 Email: monica.dewi.r@trisakti.ac.id

### ABSTRAK

**Background:** Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common form of oral cancer. SCC treatment generally uses surgical procedures, chemotherapy, etc. Currently there are more than 60% of anticancer compounds obtained from natural ingredients, one of which is *Gnetum gnetum* L. (*G. gnetum* L.) or commonly called melinjo. **Objective:** To determine whether the *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL could reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line. **Methods:** Laboratory experimental research (in vitro) was conducted using the cell line HSC-3. Cells were treated with *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL for 24 hours. Ethanol 70% was used as solvent and negative control. Doxorubicin was used as a positive control. The treated cells were analyzed using MTT assay and flow cytometry to examine changes in cell viability and apoptosis that occurred. **Results:** *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL could significantly reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line ( $p < 0.05$ ). The ability to reduce viability increased with the increase in extract concentration as many as 8,169 cells, 5,789 cells, and 3,068 cells and also induces apoptosis by  $8.33 \pm 0.93\%$ ,  $16.55 \pm 1.51\%$ , and  $28.73 \pm 0.89\%$  of cells tested sequentially. **Conclusion:** *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL for 24 hours was able to reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line.

**Kata Kunci:** *Gnetum gnetum* L., MTT assay, apoptosis, cell line HSC-3, flow cytometry, viability

### PENDAHULUAN

Kanker ditandai oleh pertumbuhan sel dengan kecepatan abnormal yang menyebabkan kematian kurang lebih 70% di dunia. Menurut WHO, kanker menyebabkan kurang lebih 9,6 juta kasus kematian di dunia setiap tahunnya. Terdapat berbagai macam jenis kanker, salah satunya adalah kanker rongga mulut yang termasuk dalam 10 peringkat insidensi kanker teratas.<sup>1</sup>

Karsinoma sel skuamosa (KSS) merupakan bentuk yang paling umum dari kanker rongga mulut. Insidensi kanker bibir dan rongga mulut di Indonesia pada tahun 2020 diestimasi sekitar 5.780 kasus dari 396.914 kasus kanker secara keseluruhan.<sup>2</sup> Perawatan KSS umumnya menggunakan prosedur pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi kombinasi, dan prosedur terbaru menggunakan obat antikanker selektif.<sup>3,4</sup>

Kemoterapi paling sering digunakan untuk mengobati kanker, akan tetapi kemoterapi menyebabkan efek samping yang tidak baik bagi tubuh seperti mual, muntah, kerontokan rambut, gangguan pengecap, sariawan, nyeri, dan sering menimbulkan kecemasan.<sup>5,6</sup> Kemoterapi merupakan obat nonselektif sehingga menyebabkan banyak sel normal yang hancur bersamaan dengan sel kanker, oleh karena itu banyak peneliti yang ingin mencari obat lain untuk sel kanker dengan meneliti zat aktif dari bahan tertentu.<sup>7</sup>

Saat ini terdapat lebih dari 60% senyawa antikanker yang diperoleh dari bahan alam.<sup>8</sup> Penelitian terdahulu menggunakan ekstrak bunga Ammi majus untuk merangsang apoptosis pada sel lini HeLa dan sel lini MCF-7,<sup>7</sup> ekstrak buah Solanum nigrum untuk merangsang apoptosis pada sel lini HepG2 dan sel lini CT26,<sup>9</sup> serta ekstrak umbi Boesenbergia pandurata untuk merangsang apoptosis pada sel HSC-3.<sup>10</sup> Sel Human Squamous Carcinoma (HSC-3) merupakan sel lini KSS rongga mulut manusia dengan potensi metastasis yang

tinggi, dan digunakan untuk meneliti obat pada kanker rongga mulut.<sup>11</sup>

Bahan alam untuk pemeliharaan kesehatan dan obat-obatan banyak terdapat di Indonesia, salah satunya adalah *Gnetum gnetum* L. (*G. gnetum* L.) atau biasa disebut melinjo.<sup>12</sup> Pada umumnya, *G. gnetum* L. dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dalam bentuk emping (terbuat dari biji *G. gnetum* L.) dan sayur asem (terdiri dari campuran biji, kulit, dan daun *G. gnetum* L.).<sup>13</sup> Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak biji *G. gnetum* L. secara signifikan dapat menghambat proliferasi sel kanker pankreas, prostat, payudara, dan usus besar, tanpa mempengaruhi sel normal.<sup>14</sup> Oleh karenanya penulis tertarik untuk meneliti tentang khasiat *G. gnetum* L. sebagai antikanker pada sel HSC-3.

Uji sitotoksitas ekstrak etanol *G. gnetum* L. terhadap sel lini HSC-3 dapat menggunakan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) dan flow cytometry. Uji MTT digunakan untuk mengetahui viabilitas dari sel, pengukurannya dilakukan dengan pelarutan produk formazan hasil dari pengubahan garam tetrazolium (biasa menggunakan Dimethyl Sulfoxide (DMSO)/isopropanol yang diasamkan), dan pembacaan hasilnya menggunakan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader.<sup>15</sup> Flow cytometry digunakan untuk mendapatkan data dari deoxyribonucleic acid (DNA) dan populasi sel, yang kemudian dilanjutkan dengan analisis sub G1 untuk mendeteksi kematian sel.<sup>16,17</sup>

### METODOLOGI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (in vitro) yang dilakukan di Laboratorium ProSTEM dan Laboratorium Aretha Medika Utama pada bulan Februari–Mei 2021. Sampel penelitian yang digunakan *G. gnetum* L. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji *G. gnetum* L. konsentrasi 1,

10, 100 µg/mL, dengan variabel tergantung berupa viabilitas dan apoptosis sel lini HSC-3. Pemeriksaan viabilitas menggunakan uji MTT dan pemeriksaan apoptosis menggunakan uji flow cytometry serta analisis sub G1. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program IBM SPSS statistik versi 25.

**HASIL**

Viabilitas dan apoptosis yang terjadi dihitung melalui pengukuran yang dihasilkan dari uji MTT, flow cytometry, dan analisis sub G1 yang dihasilkan dari penelitian. Sel lini HSC-3 diberi perlakuan dengan menggunakan kontrol negatif berupa etanol yang digunakan dalam pembuatan ekstrak, dan kontrol positif berupa Doksorubisin, selain itu diberi ekstrak etanol biji G. gnemon L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL. Untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol biji G. gnemon L., sel lini HSC-3 diberi perlakuan selama 24 jam. Proses ekstraksi dilakukan dengan mencampur 500 g bubuk simplisia biji G. gnemon L. dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1920 mL. Hasil ekstraksi maserasi diperoleh melalui penyaringan setiap 24 jam selama 3 hari, sehingga didapatkan volume filtrat sebanyak 1280 mL dan berat rendemen ekstrak sebanyak 26,84 g (5,36%). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa aktif dari biji G. gnemon L. dilakukan pengujian fitokimia dan pengujian keberadaan suatu senyawa dengan metode analisis mass spectrofotometry (MS) pada ekstrak etanol biji G. gnemon L. yang digunakan dalam penelitian ini. Pada hasil uji fitokimia ekstrak etanol biji G. gnemon L. didapatkan hasil kandungan Flavonoid, Fenol, Tanin, Steroid, Terpenoid rendah dan kandungan Alkaloid yang tinggi. Serta tidak ditemukan kandungan Saponin dan Triterpenoid.

Viabilitas sel dan apoptosis yang dipengaruhi oleh perlakuan dengan ekstrak etanol biji G. gnemon L. konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL diukur melalui uji MTT dan flow cytometry. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali dengan jumlah pengulangan sebanyak dua kali dengan total enam kali pengulangan. Dari hasil penelitian didapatkan dua data, yaitu data hasil uji MTT dan data hasil flow cytometry. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

**Tabel 1.** Data hasil uji MTT

Kelompok Perlakuan	Densitas Optik Sel Pada Uji MTT						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
Sel HSC-3 + Medium	2,3 5	2,4 4	2,32	2,3 8	2,4 4	2,39	2,39	0,05
Etanol 70%	2,2 2	2,2 4	2,22	2,2 4	2,2 3	2,23	2,23	0,01
Doksorubisin 1 µM	0,5 3	0,5 3	0,53	0,5 4	0,5 3	0,54	0,53	0,01
G. gnemon L. 1 µg/mL	2,0 8	2,1 5	2,07	2,0 7	1,8 7	1,99	2,06	0,07
G. gnemon L. 10 µg/mL	1,4 4	1,5 9	1,81	1,6 1	1,4 8	1,82	1,55	0,08
G. gnemon L. 100 µg/mL	1,0 7	0,8 8	0,89	1,1 2	0,8 2	1,13	0,98	0,14

**Tabel 2.** Data hasil uji flow cytometry

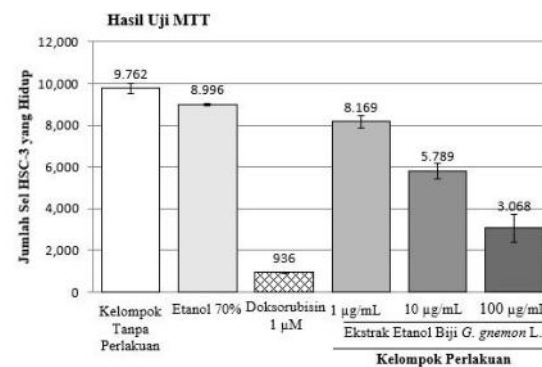
Kelompok Perlakuan	Persentase Jumlah Sel Apoptosis Pada Uji ke-						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
Sel HSC-3 + Medium	5,1	4,7	4,5	4,3	4,7	4,8	4,85	0,27
Etanol 70%	7,1	7,7	7,4	7,4	7,3	7,1	7,33	0,22
Doksorubisin 1 µM	78,	78,	87,	72,	75,	70,		
G. gnemon L. 1 µg/mL	8,8	6,7	8,2	8	8,2	8,1	8,33	0,93
G. gnemon L. 10 µg/mL	18,	14,	18,	17,	15,	17,		
G. gnemon L. 100 µg/mL	28,	27,	28,	28,	28,	29,		
	8	8	3	1	5	9	28,73	0,89

Berikut merupakan tabel konversi hasil uji MTT dari densitas optik menjadi jumlah sel hidup. Konversi

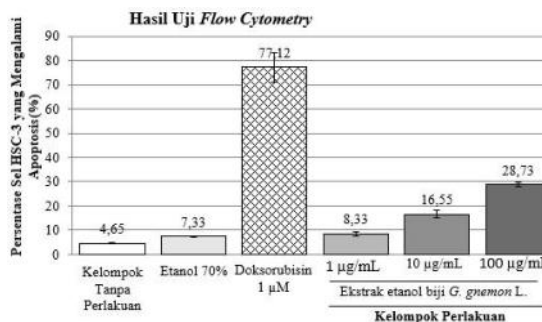
dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel hidup dalam well sebelum diletakkan dan dibiarkan selama 1 hari dalam medium, setelah itu dihitung jumlah sel yang hidup dalam well setelah 1 hari dalam medium menggunakan cell counter. Setelah didapat jumlah sel dalam well dibuat persamaan menggunakan analisis regresi linier sederhana untuk menghitung jumlah sel hidup dalam well pada kelompok kontrol negatif, positif, dan perlakuan dengan ekstrak etanol biji G. gnemon L.

**Tabel 3.** Tabel konversi hasil uji MTT menjadi jumlah sel

Kelompok Perlakuan	Densitas Optik	Konversi dengan Analisis Regresi Linier Sederhana
Sel HSC-3 + Medium	2,39	9.762
Etanol 70%	2,23	8.996
Doksorubisin 1 µM	0,53	936
G. gnemon L. 1 µg/mL	2,06	8.169
G. gnemon L. 10 µg/mL	1,55	5.789
G. gnemon L. 100 µg/mL	0,98	3.068



**Gambar 1.** Grafik hasil uji MTT dengan melihat jumlah sel HSC-3 yang hidup dengan waktu paparan 24 jam



**Gambar 2.** Grafik hasil uji flow cytometry dengan melihat persentase sel HSC-3 yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji dengan waktu paparan 24 jam.

Pengujian tingkat sitotoksikitas dari ekstrak etanol biji G. gnemon L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL dapat diukur melalui persentase apoptosis yang terjadi melalui flow cytometry dengan analisis sub G1 dan uji viabilitas sel melalui uji MTT, data dilakukan uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk. Penggunaan metode ini didasari oleh jumlah sampel digunakan yang kurang dari 50 sampel. Hasil uji normalitas didapatkan sebaran data kelompok Sel HSC-3 + Medium (tanpa perlakuan), Etanol 70%, Doksorubisin 1 µM, G. gnemon L. 1 µg/mL, G. gnemon L. 100 µg/mL terdistribusi normal dan G. gnemon L. 10 µg/mL tidak terdistribusi normal. Data hasil uji MTT dianalisis menggunakan metode Kruskal-Wallis dengan hasil p = 0,000 < 0,05 sedangkan data hasil uji flow cytometry dianalisis menggunakan metode ANOVA dengan hasil p=0,004 < 0,05. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji G. gnemon L. dapat

menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3. Setelah itu dilakukan uji lanjutan Mann-Whitney pada hasil uji MTT dan uji lanjutan Post-Hoc Tukey pada hasil uji flow cytometry untuk mengetahui efektifitas antar variabel.

**PEMBAHASAN**

KSS merupakan bentuk yang paling umum dari kanker rongga mulut. Insidensi kanker bibir dan rongga mulut di Indonesia pada tahun 2020 diestimasi sekitar 5.780 kasus dari 396.914 kasus kanker secara keseluruhan.<sup>2</sup> Penelitian yang digunakan untuk meneliti obat pada kanker rongga mulut menggunakan sel lini HSC-3. Sel lini HSC-3 merupakan sel lini KSS rongga mulut manusia dengan potensi metastasis yang tinggi.<sup>11</sup>

Saat ini terdapat lebih dari 60% senyawa antikanker yang diperoleh dari bahan alam.<sup>8</sup> Bahan alam untuk pemeliharaan kesehatan dan obat-obatan banyak terdapat di Indonesia, salah satunya adalah Gnetum gnemon L. (*G. gnemon L.*) atau biasa disebut melinjo.<sup>12</sup>

Uji fitokimia yang dilakukan pada ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan kandungan alkaloid dalam jumlah yang tinggi dan kandungan flavonoid, fenol, tannin, steroid, dan terpenoid dalam jumlah yang rendah. Uji keberadaan senyawa dengan metode Mass Spectrofotometry menunjukkan adanya kandungan gnetin C, gnetol, stilbenoid, resveratrol, pravastatin, dan enalaprilat pada ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* yang digunakan.

Alkaloid yang terdapat pada ekstrak *G. gnemon L.* memiliki sifat anti inflamasi, anti kanker, dan pereda nyeri.<sup>18,19</sup> Gnetin C memiliki potensi untuk menghambat atau mengobati beberapa jenis kanker tertentu. Kandungan alkaloid dalam jumlah tinggi dan kandungan gnetin C pada ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* terbukti dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel lini HSC-3. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada Tabel 1 dan Tabel 2, ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL dapat menurunkan viabilitas sel lini HSC-3 menjadi 8.169 sel, 5.789 sel, dan 3.068 sel dan menginduksi apoptosis sebesar 8,33 ± 0,93%, 16,55 ± 1,51%, dan 28,73 ± 0,89% dari sel yang diuji.

Penelitian ini menggunakan kontrol negatif etanol 70% yang dibiarkan selama 3 hari mengikuti proses ekstraksi maserasi. Penyimpanan etanol dalam tabung tanpa tutup selama 3 jam menunjukkan penurunan konsentrasi sebesar 12,6% dari konsentrasi sebelumnya.<sup>20</sup> Dapat disimpulkan etanol 70% yang dibiarkan selama 3 hari mengikuti proses ekstraksi maserasi mengandung lebih sedikit persentase alkohol dan lebih tidak beracun bagi tubuh. Menurut data penelitian pada Tabel 1 dan Tabel 2, kelompok kontrol negatif etanol 70% menunjukkan sekitar 8.996 sel hidup dan menginduksi apoptosis sebanyak 7,33%, dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan sekitar 9.762 sel hidup dan selama 24 jam dalam medium puasa DMEM mengalami persentase apoptosis sebesar 4,65%. Uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa etanol 70% dan medium puasa DMEM tidak efektif dalam menginduksi apoptosis ( $p=0,491 > 0,05$ ; tidak berbeda bermakna antara kelompok kontrol negatif etanol 70% dan kelompok tanpa perlakuan).

Penelitian ini menggunakan Doksorubisin 1 µM sebagai kontrol positif. Doksorubisin merupakan salah satu obat anti kanker yang paling efektif pada beberapa jenis kanker sehingga kemampuannya sudah teruji untuk menginduksi apoptosis.<sup>21</sup> Doksorubisin menghambat sintesis DNA dan RNA serta menghambat enzim topoisomerase II, menyebabkan kerusakan DNA dan induksi apoptosis.<sup>22</sup> Hal ini dibuktikan dalam hasil penelitian uji MTT dan uji flow cytometry pada Tabel 1 dan Tabel 2, kelompok kontrol positif Doksorubisin menurunkan viabilitas sel lini HSC-3 menjadi 936 sel dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan sekitar 9.762 sel hidup dan kontrol negatif yang menunjukkan sekitar 8.996 sel hidup. Kelompok kontrol positif Doksorubisin menginduksi apoptosis sebesar 77,12 ± 6,06% dari sel yang diuji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang menginduksi apoptosis sebanyak 7,33% dan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan 4,65% persentase sel apoptosis.

Uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa Doksorubisin 1 µM lebih efektif dalam menurunkan viabilitas sel dan menginduksi apoptosis dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif etanol 70% ( $p=0,004$  dan  $p=0,000 < 0,05$ ; ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif Doksorubisin 1 µM dengan kelompok kontrol negatif etanol 70%) dan kelompok tanpa perlakuan ( $p=0,004$  dan  $p=0,000 < 0,05$ ; ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif Doksorubisin 1 µM dengan kelompok tanpa perlakuan).

Penelitian ini menggunakan uji MTT karena uji MTT telah digunakan secara luas dan populer di laboratorium akademik sebagaimana dibuktikan oleh ribuan artikel yang telah diterbitkan, dan uji MTT tidak menyebabkan pengukuran viabilitas sel yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dalam screening sitotoksitas bahan pengisi saluran akar, karena sebagian besar hasil pengujian sesuai dengan yang diperoleh dari uji viabilitas lainnya.<sup>23</sup> Hasil dari uji MTT adalah densitas optik yang ditentukan dari warna larutan yang diuji, semakin gelap warna yang dihasilkan, semakin besar jumlah sel yang aktif secara metabolik yang berarti semakin tinggi viabilitas sel yang diuji.<sup>24</sup>

Penelitian ini menggunakan flow cytometry untuk mendeteksi apoptosis dan dilanjutkan dengan analisis sub G1 untuk menghitung persentase apoptosis yang terjadi. Menurut data penelitian pada Tabel 2, didapat persentase sel apoptosis pada kelompok perlakuan dengan ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL sebesar 8,33 ± 0,93% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji; 16,55 ± 1,51% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji; dan 28,73 ± 0,89% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji secara berurutan; sebesar 4,65 ± 0,27% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok tanpa perlakuan; sebesar 7,33 ± 0,22% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok kontrol negatif etanol, dan sebesar 77,12 ± 6,06% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok kontrol positif.

Berdasarkan hasil uji statistik yang dilakukan pada kedua data hasil MTT dan flow cytometry dapat disimpulkan bahwa semakin banyak jumlah ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* yang digunakan maka semakin rendah viabilitas sel lini HSC-3 dan ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* mulai efektif dalam menginduksi apoptosis dari konsentrasi minimal 10 µg/mL dan mengalami peningkatan pada penggunaan konsentrasi 100 µg/mL dalam waktu paparan ekstrak selama 24 jam.

Berdasarkan penelitian mengenai ekstrak *G. gnemon L.* dan Gnetin C pada beberapa sel kanker, ekstrak *G. gnemon L.* memiliki IC50 terhadap beberapa sel kanker seperti isi pada Tabel 4.114 Tabel 4 berisikan beberapa sel kanker dari penelitian yang sudah pernah dilakukan.

**Tabel 4.** IC50 ekstrak biji *G. gnemon L.* terhadap proliferasi sel kanker.<sup>14</sup>

Sel Lini	Deskripsi	Ekstrak Biji <i>G. gnemon L.</i> (µg/mL) (Rerata)
PANC-1	Sel kanker pankreas manusia	61,27 ± 2,58
AsPC-1	Sel kanker pankreas manusia	53,74 ± 3,2
PC-3	Sel kanker prostat manusia (AR negatif, tidak tergantung androgen)	38,26 ± 0,24
LNCaP	Sel kanker prostat manusia (AR positif, tergantung androgen)	34,26 ± 0,11
MCF-7	Sel kanker payudara manusia	37,3 ± 0,9
HT-29	Sel kanker usus besar manusia	39,33 ± 4,9
Colon-26	Sel kanker usus besar mencit	36,3 ± 4,9
HEK-293T	Sel epitel ginjal embrio manusia	87,37 ± 2,34

\*Jumlah IC50 dari ekstrak biji *G. gnemon L.* secara signifikan lebih tinggi di sel epitel normal dibandingkan dengan sel kanker

Berdasarkan tabel diatas, perlu dilakukan perhitungan IC50 pada ekstrak etanol biji *G. gnemon L.* pada sel lini HSC-3 sebagai pembanding dengan IC50 ekstrak biji *G. gnemon L.* pada sel lini lain. Perhitungan dilakukan dengan mengambil data perlakuan dengan



ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dari hasil uji MTT dengan jumlah sel dan membuat persamaan dengan analisis regresi linier sederhana untuk menemukan konsentrasi minimum untuk menghambat setengah populasi sel kanker HSC-3. Didapatkan hasil IC50 atau konsentrasi minimum untuk menghambat setengah populasi sel dari ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. terhadap sel lini HSC-3 dengan waktu paparan ekstrak selama 24 jam sebesar 55,59 µg/mL.

Klasifikasi aktivitas antikanker berdasarkan nilai IC50 adalah: nilai IC50 ≤ 20 µg/mL tergolong kuat, nilai IC50 21 - 200 µg/mL tergolong sedang, nilai IC50 201 - 500 µg/mL tergolong lemah, dan nilai IC50 > 500 µg/mL tergolong non-sitotoksik. Nilai IC50 ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. tergolong memiliki tingkat sitotoksik sedang.

Berikut adalah nilai IC50 dari ekstrak tanaman lain sebagai pembandingan nilai IC50: *Punica granatum* L. dalam bentuk Pomegranate Extract sebesar 80,53 µg/mL pada sel lini Ca9-22 dalam waktu paparan 24 jam; 100,34 µg/mL pada sel lini HSC-3 dalam waktu paparan 24 jam; 108,12 µg/mL pada sel lini OC-2 dalam waktu paparan 24 jam; 26 dan ekstrak methanol *Myrmecodia pendens* (M. pendens) memiliki IC50 sebesar 5 mg/mL atau sebesar 5000 µg/mL pada sel lini HSC-3 dengan waktu paparan ekstrak selama 24 jam.27

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dapat menurunkan viabilitas sel dan menginduksi apoptosis, dengan konsentrasi 10 µg/mL dan 100 µg/mL sebagai konsentrasi efektif yang dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3.

Penelitian ini didukung oleh penelitian efek antikanker ekstrak biji *G. gnemon* L. lainnya.14,28 Kandungan alkaloid yang terdapat paling tinggi dalam *G. gnemon* L. juga dapat menjadi alasan mengapa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel lini HSC-3.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. secara signifikan dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3. Ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dengan konsentrasi 10 µg/mL sebagai konsentrasi minimal yang efektif untuk menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3 secara signifikan dalam waktu paparan 24 jam.

Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. terhadap sel kanker lain, agar membantu pengembangan obat yang selektif menurunkan dan menginduksi apoptosis pada sel kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Rivera C. Essentials of oral cancer. Edisi ke-8. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Sep 1;8(9):11884-94.
- Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249
- Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. J Cancer Ther. 2012; 3 (4): 263-8.
- Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. Front Pharmacol. 2018;9:1300.
- Chan HK, Ismail S. Side Effects of Chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: Experiences, Perceptions and Informational needs from Clinical Pharmacists. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(13):5305-9
- PingLei C. Cancer- and Chemotherapy-Related Symptoms and the Use of Complementary and Alternative Medicine. Asia Pac J Oncol Nurs. 2019 Maret; 6(1): 4.
- Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, et al. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Bagian 2: Review Study. Edisi ke-22. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. SAGE Publications Ltd; 2017 Oktober. hlm. 982-95.
- Rayan A, Raiyn J, Falah M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. PLoS One. 2017;12(11):e0187925.
- Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, et al. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of Cucurbita pepo and Solanum nigrum on HepG2 and CT26 cancer cell lines. Pharmacogn Mag. 2010;6(23):176-9.
- Husnunnisa, Ismed F, Taher M, et al. Screening of some Sumatran medicinal plants and selected secondary metabolites for their cytotoxic potential against MCF-7 and HSC-3 cell lines. J Res Pharm. 2019;23 (4):770-6.
- Yu FS, Yang JS, Yu CS, et al. Saffrole induces apoptosis in human oral cancer HSC-3 cells. J Dent Res. 2011;90(2): 168-74.
- Konno H, Kanai Y, Katagiri M., et al. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Seed Extract Decreases Serum Uric Acid Levels in Nonobese Japanese Males: A Randomized Controlled Study. Evidence-Based Complement Alternat Med. 2013;2013:589169.
- Sari NK, Soemardji AA, Fidrianny I. The Effect of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Leaves and Melinjo Peel Extracts on Induced-Hyperuricemia Male Rats Model. J Med Heal. 2019; 2(4):956-64.
- Narayanan NK, Kunimasa K, Yamori Y, et al. Antitumor activity of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract in human and murine tumor models in vitro and in a colon-26 tumor-bearing mouse model in vivo. Cancer Med. 2015 November; 4 (11): 1767-80.
- Gautam G. General principles of MTT assay method. 2018 November; 4-6. Available from [https://www.researchgate.net/publication/329167834\\_General\\_principles\\_of\\_MTT\\_assay\\_method](https://www.researchgate.net/publication/329167834_General_principles_of_MTT_assay_method)
- McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5.1.1-5.1.11
- Murad H, Hawat M, Ekhtiar A, et al. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. Cancer Cell Int. 2016;16:39.
- Kardela W, Fauziah F, Mayesri S. Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) : Aktivitas Sebagai Antidiare. J Farm Higea. 2018; 10(1):49-56.
- Ruano P, Delgado LL, Picco S, Villegas L, Tonelli F, Merlo M, et al. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. Intech. 2016 Juni; 13.
- Saracevic A, Simundic A, Dukic L. The stability of ethanol in unstoppered tubes. Clin Biochem. 2014;47(1-2): 92-5.
- Fan H, Li H, Liu G, et al. Doxorubicin combined with low intensity ultrasound suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):1-13.
- Schulmeister L. Doxorubicin. Clin J Oncol Nurs.1998;2(3):115-6
- Pintor AVB, Queiroz LD, Barcelos R, et al. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. Int Endod J. 2020;53(10):1348-73.
- Markonssian S. Assag Guidance Manual [internet]. Bethesda MD: Eli Lilly & Co and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- Geran R, Greenberg N, Macdonald M, et al. Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products against Animal Tumors and Other Biological Systems. Cancer Chemother Reports. 1972;13:1-87.
- Peng SY, Lin LC, Chen SR, et al. Pomegranate extract (Pomx) induces mitochondrial dysfunction and apoptosis of oral cancer cells. Antioxidants. 2021;10 (7):1117.
- Irfanita N, Eddie S, Aziz NA. Preliminary investigations of anti-cancer properties of *Myrmecodia pendens* on human oral cancer HSC-3 cell lines. Mater Today Proc. 2019; 16: 2197-203.
- Kumar A, Dholakia K, Sikorska G., Mta1-dependent anticancer activity of gnetin c in prostate cancer. Nutrients. 2019;11(9):2096

# Pengaruh ekstrak biji melinjo terhadap viabilitas dan apoptosis sel hsc-3

*by* Drg. Dewi Ranggaini 3

---

**Submission date:** 12-Apr-2023 04:54AM (UTC+0700)

**Submission ID:** 2061940128

**File name:** document-1.pdf (447.07K)

**Word count:** 3883

**Character count:** 21413

## Pengaruh ekstrak biji melinjo terhadap viabilitas dan apoptosis sel hsc-3

Monica Dewi<sup>1</sup>, Ranggaini<sup>1</sup>, Johni Halim<sup>1</sup>, Richard Tridarmawan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

<sup>2</sup>Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

Jl. Kyai Tapa, No. 1, RT.5/RW.9, Tomang, Grogol Petamburan, Jakarta Barat 11440

Telepon: (021) 5655786 Email: monica.dewi.r@trisakti.ac.id

### ABSTRAK

**Background:** Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common form of oral cancer. SCC treatment generally uses surgical procedures, chemotherapy, etc. Currently there are more than 60% of anticancer compounds obtained from natural ingredients, one of which is *Gnetum gnetum* L. or commonly called melinjo. **Objective:** To determine whether the *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL could reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line. **Methods:** Laboratory experimental research (in vitro) was conducted using the cell line HSC-3. Cells were treated with *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL for 24 hours. Ethanol 70% was used as solvent and negative control. Doxorubicin was used as a positive control. The treated cells were analyzed using MTT assay and flow cytometry to examine changes in cell viability and apoptosis that occurred. **Results:** *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL could significantly reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line ( $p < 0.05$ ). The ability to reduce viability increased with the increase in extract concentration as many as 8,169 cells, 5,789 cells, and 3,068 cells and also induces apoptosis by  $8.33 \pm 0.18\%$ ,  $16.55 \pm 1.51\%$ , and  $28.73 \pm 0.89\%$  of cells tested sequentially. **Conclusion:** *G. gnetum* L. seed ethanolic extract with concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL for 24 hours was able to reduce viability and induce apoptosis in the HSC-3 cell line.

**Kata Kunci:** *Gnetum gnetum* L., MTT assay, apoptosis, cell line HSC-3, flow cytometry, viability

### PENDAHULUAN

Kanker ditandai oleh pertumbuhan sel dengan kecepatan abnormal yang menyebabkan kematian kurang lebih 70% di dunia. Menurut WHO, kanker menyebabkan kurang lebih 9,6 juta kasus kematian di dunia setiap tahunnya. Terdapat berbagai macam jenis kanker, salah satunya adalah kanker rongga mulut yang termasuk dalam 10 peringkat insidensi kanker teratas.<sup>1</sup>

Karsinoma sel skuamosa (KSS) merupakan bentuk yang paling umum dari kanker rongga mulut. Insidensi kanker bibir dan rongga mulut di Indonesia pada tahun 2020 diestimasi sekitar 5.780 kasus dari 396.914 kasus kanker secara keseluruhan.<sup>2</sup> Perawatan KSS umumnya menggunakan prosedur pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi kombinasi, dan prosedur terbaru menggunakan obat antikanker selektif.<sup>3,4</sup>

Kemoterapi paling sering digunakan untuk mengobati kanker, akan tetapi kemoterapi menyebabkan efek samping yang tidak baik bagi tubuh seperti mual, muntah, kerontokan rambut, gangguan pengecap, sariawan, nyeri, dan sering menimbulkan kecemasan.<sup>5,6</sup> Kemoterapi merupakan obat nonselektif sehingga menyebabkan banyak sel normal yang hancur bersamaan dengan sel kanker, oleh karena itu banyak peneliti yang ingin mencari obat lain untuk sel kanker dengan meneliti zat aktif dari bahan tertentu.<sup>7</sup>

Saat ini terdapat lebih dari 60% senyawa antikanker yang diperoleh dari bahan alam.<sup>8</sup> Penelitian terdahulu menggunakan ekstrak bunga Ammi majus untuk merangsang apoptosis pada sel lini HeLa dan sel lini MCF-7,7 ekstrak buah Solanum nigrum untuk merangsang apoptosis pada sel lini HepG2 dan sel lini CT26,9 serta ekstrak umbi Boesenbergia pandurata untuk merangsang apoptosis pada sel HSC-3.<sup>10</sup> Sel Human Squamous Carcinoma (HSC-3) merupakan sel lini KSS rongga mulut manusia dengan potensi metastasis yang

tinggi, dan digunakan untuk meneliti obat pada kanker rongga mulut.<sup>11</sup>

Bahan alam untuk pemeliharaan kesehatan dan obat-obatan banyak terdapat di Indonesia, salah satunya adalah *Gnetum gnetum* L. (*G. gnetum* L.) atau biasa disebut melinjo.<sup>12</sup> Pada umumnya, *G. gnetum* L. dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dalam bentuk emping (terbuat dari biji *G. gnetum* L.) dan sayur asem (terdiri dari campuran biji, kulit, dan daun *G. gnetum* L.).<sup>13</sup> Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak biji *G. gnetum* L. secara signifikan dapat menghambat proliferasi sel kanker pankreas, prostat, payudara, dan usus besar, tanpa mempengaruhi sel normal.<sup>14</sup> Oleh karenanya penulis tertarik untuk meneliti tentang khasiat *G. gnetum* L. sebagai antikanker pada sel HSC-3.

Uji sitotoksitas ekstrak etanol *G. gnetum* L. terhadap sel lini HSC-3 dapat menggunakan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) dan flow cytometry. Uji MTT digunakan untuk mengetahui viabilitas dari sel, pengukurannya dilakukan dengan pelarutan produk formazan hasil dari perubahan garam tetrazolium (biasa menggunakan Dimethyl Sulfoxide (DMSO)/isopropanol yang digunakan), dan pembacaan hasilnya menggunakan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader.<sup>15</sup> Flow cytometry digunakan untuk mendapatkan data dari deoxyribonucleic acid (DNA) dan populasi sel, yang kemudian dilanjutkan dengan analisis sub G1 untuk mendeteksi kematian sel.<sup>16,17</sup>

### METODOLOGI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (in vitro) yang dilakukan di Laboratorium ProSTEM dan Laboratorium Aretha Medika Utama pada bulan Februari-Mei 2026. Sampel penelitian yang digunakan *G. gnetum* L. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji *G. gnetum* L. konsentrasi 1,



10, 100 µg/mL, dengan variabel tergantung berupa viabilitas dan apoptosis sel lini HSC-3. Pemeriksaan viabilitas menggunakan uji MTT dan pemeriksaan apoptosis menggunakan uji flow cytometry serta analisis sub G1. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program IBM SPSS statistik versi 25.

**HASIL**

Viabilitas dan apoptosis yang terjadi dihitung melalui pengukuran yang dihasilkan dari uji MTT, flow cytometry, dan analisis sub G1 yang dihasilkan dari penelitian. Sel lini HSC-3 diberi perlakuan dengan menggunakan kontrol negatif berupa etanol yang digunakan dalam pembuatan ekstrak, dan kontrol positif berupa Doksorubisin, selain itu diberi ekstrak etanol biji G. gnomon L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL. Untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol biji G. gnomon L., sel lini HSC-3 diberi perlakuan selama 24 jam. Proses ekstraksi dilakukan dengan mencampur 500 g bubuk simplisia biji G. gnomon L. dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1920 mL. Hasil ekstraksi maserasi diperoleh melalui penyaringan setiap 24 jam selama 3 hari, sehingga didapatkan volume filtrat sebanyak 1280 mL dan berat rendemen ekstrak sebanyak 26,84 g (5,36%). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa aktif dari biji G. gnomon L. dilakukan pengujian fitokimia dan pengujian keberadaan suatu senyawa dengan metode analisis mass spectrometry (MS) pada ekstrak etanol biji G. gnomon L. yang digunakan dalam penelitian ini. Pada hasil uji fitokimia ekstrak etanol biji G. gnomon L. didapatkan hasil kandungan Flavonoid, Fenol, Tanin, Steroid, Terpenoid rendah dan kandungan Alkaloid yang tinggi. Serta tidak ditemukan kandungan Saponin dan Triterpenoid.

Viabilitas sel dan apoptosis yang dipengaruhi oleh perlakuan dengan ekstrak etanol biji G. gnomon L. konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL diukur melalui uji MTT dan flow cytometry. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali dengan jumlah pengulangan sebanyak dua kali dengan total enam kali pengulangan. Dari hasil penelitian didapatkan dua data, yaitu data hasil MTT dan data hasil flow cytometry. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Data hasil uji MTT

Kelompok Perlakuan	Densitas Optik Sel Pada Uji MTT						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
Sel HSC-3 + Medium	2,3 5	2,4 4	2,32 3	2,3 8	2,4 4	2,39 3	2,39	0,05
Etanol 70%	2,2 2	2,2 4	2,22 4	2,2 3	2,2 3	2,23 3	2,23	0,01
Doksorubisin 1 µM	0,5 3	0,5 3	0,5 4	0,5 3	0,5 3	0,54 3	0,53	0,01
G. gnomon L. 1 µg/mL	2,0 4	2,1 9	2,07 8	2,0 7	1,9 7	1,99 7	2,08	0,07
G. gnomon L. 10 µg/mL	1,4 4	1,5 9	1,61 8	1,6 8	1,4 8	1,62 8	1,55	0,08
G. gnomon L. 100 µg/mL	1,0 7	0,8 8	0,89 8	1,1 9	0,8 8	1,13 8	0,88	0,14

Tabel 2. Data hasil uji flow cytometry

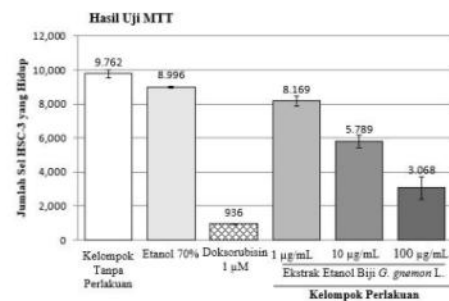
Kelompok Perlakuan	Persentase Jumlah Sel Apoptosis Pada Uji ke-						Rerata	SD
	1	2	3	4	5	6		
Sel HSC-3 + Medium	5,1	4,7	4,5	4,3	4,7	4,6	4,66	0,27
Etanol 70%	7,1	7,7	7,4	7,4	7,3	7,1	7,33	0,22
Doksorubisin 1 µM	78	78	87	72	75	76	77,12	6,88
G. gnomon L. 1 µg/mL	8,8	8,7	9,2	9	8,2	8,1	8,33	0,93
G. gnomon L. 10 µg/mL	18	14	16	17	15	17	16,55	1,51
G. gnomon L. 100 µg/mL	28	27	28	28	28	28	28,73	0,39

Berikut merupakan tabel konversi hasil uji MTT dari densitas optik menjadi jumlah sel hidup. Konversi

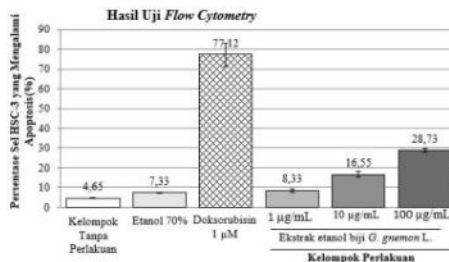
dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel hidup dalam well sebelum diletakan dan dibiarkan selama 1 hari dalam medium, setelah itu dihitung jumlah sel yang hidup dalam well setelah 1 hari dalam medium menggunakan cell counter. Setelah didapat jumlah sel dalam well dibuat persamaan menggunakan analisis regresi linier sederhana untuk menghitung jumlah sel hidup dalam well pada kelompok kontrol negatif, positif, dan perlakuan dengan ekstrak etanol biji G. gnomon L.

Tabel 3. Tabel konversi hasil uji MTT menjadi jumlah sel

Kelompok Perlakuan	Densitas Optik	Konversi dengan Analisis Regresi Linier Sederhana
Sel HSC-3 + Medium	2,39	9.762
Etanol 70%	2,23	8.996
Doksorubisin 1 µM	0,53	936
G. gnomon L. 1 µg/mL	2,08	8.169
G. gnomon L. 10 µg/mL	1,55	5.789
G. gnomon L. 100 µg/mL	0,88	3.068



Gambar 1. Grafik hasil uji MTT dengan melihat jumlah sel HSC-3 yang hidup dengan waktu paparan 24 jam



Gambar 2. Grafik hasil uji flow cytometry dengan melihat persentase sel HSC-3 yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji dengan waktu paparan 24 jam.

Penggunaan tingkat sitotoksitas dari ekstrak etanol biji G. gnomon L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL dapat diukur melalui persentase apoptosis yang terjadi melalui flow cytometry dengan analisis sub G1 dan uji viabilitas melalui uji MTT, data dilakukan uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk. Penggunaan metode ini didasari oleh jumlah sampel digunakan yang kurang dari 50 sampel. Hasil uji normalitas didapatkan sebaran data kelompok Sel HSC-3 + Medium (tanpa perlakuan), Etanol 70%, Doksorubisin 1 µM, G. gnomon L. 1 µg/mL, G. gnomon L. 100 µg/mL terdistribusi normal dan G. gnomon L. 10 µg/mL tidak terdistribusi normal. Data hasil uji MTT dianalisis menggunakan metode Kruskal-Wallis dengan hasil p = 0,000 < 0,05 sedangkan data hasil uji flow cytometry dianalisis menggunakan metode ANOVA dengan hasil p = 0,004 < 0,05. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji G. gnomon L. dapat

menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3. Setelah dilakukan uji lanjutan Mann-Whitney pada hasil uji MTT dan uji lanjutan Post-Hoc Tukey pada hasil uji flow cytometry untuk mengetahui efektifitas antar variabel.

#### PEMBAHASAN

KSS merupakan bentuk yang paling umum dari kanker rongga mulut. Insidensi kanker bibir dan rongga mulut di Indonesia pada tahun 2020 diestimasi sekitar 5.780 kasus dari 396.914 kasus kanker secara keseluruhan.<sup>2</sup> Penelitian yang digunakan untuk meneliti obat pada kanker rongga mulut menggunakan sel lini HSC-3. Sel lini HSC-3 merupakan sel lini KSS rongga mulut manusia dengan potensi metastasis yang tinggi.<sup>1</sup>

Saat ini terdapat lebih dari 90% senyawa antikanker yang diperoleh dari bahan alam.<sup>8</sup> Bahan alam untuk pemeliharaan kesehatan dan obat-obatan banyak terdapat di Indonesia, salah satunya adalah *Gnetum gnemon* L. (*G. gnemon* L.) atau biasa disebut melinjo.<sup>12</sup>

Uji fitokimia yang dilakukan pada ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan kandungan alkaloid dalam jumlah yang tinggi dan kandungan flavonoid, fenol, tannin, steroid, dan terpenoid dalam jumlah yang rendah. Uji keberadaan senyawa dengan metode Mass Spectrofotometry menunjukkan adanya kandungan gnetin C, gnetol, stilbenoid, resveratrol, pravastatin, dan enalaprilat pada ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. yang digunakan.

Alkaloid yang terdapat pada ekstrak *G. gnemon* L. memiliki sifat anti inflamasi, anti kanker, dan pereda nyeri.<sup>18,19</sup> Gnetin C memiliki potensi untuk menghambat atau mengobati beberapa jenis kanker tertentu. Kandungan alkaloid dalam jumlah tinggi dan kandungan gnetin C pada ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. terbukti dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel lini HSC-3. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada sel 1 dan Tabel 2, ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL dapat menurunkan viabilitas sel lini HSC-3 menjadi 8.169 sel, 5.789 sel, dan 3.068 sel dan menginduksi apoptosis sebesar 8,33 ± 0,93%, 16,55 ± 1,51%, dan 28,73 ± 0,89% dari sel yang diuji.

Penelitian ini menggunakan kontrol negatif etanol 70% yang dibiarkan selama 3 hari mengikuti proses ekstraksi maserasi. Penyimpanan etanol dalam tabung tanpa tutup selama 3 jam menunjukkan penurunan konsentrasi sebesar 12,6% dari konsentrasi sebelumnya.<sup>20</sup> Dapat disimpulkan etanol 70% yang dibiarkan selama 3 hari mengikuti proses ekstraksi maserasi mengandung lebih sedikit pektin alkohol dan lebih tidak beracun bagi tubuh. Menurut data penelitian pada Tabel 1 dan Tabel 2, kelompok kontrol negatif etanol 70% menunjukkan sekitar 8.996 sel hidup dan menginduksi apoptosis sebanyak 7,33%, dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan sekitar 9.762 sel hidup dan selama 24 jam dalam medium puasa DMEM mengalami persentase apoptosis sebesar 4,65%. Uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa etanol 70% dan medium puasa DMEM tidak efektif dalam menginduksi apoptosis ( $p=0,491 > 0,05$ ; tidak berbeda bermakna antara kelompok kontrol negatif etanol 70% dan kelompok tanpa perlakuan).

Penelitian ini menggunakan Doksorubisin 1 µM sebagai kontrol positif. Doksorubisin merupakan salah satu obat anti kanker yang paling efektif pada beberapa jenis kanker sehingga kemampuannya sudah teruji untuk menginduksi apoptosis.<sup>21</sup> Doksorubisin menghambat sintesis DNA dan RNA serta menghambat enzim topoisomerase II, menyebabkan kerusakan DNA dan induksi apoptosis.<sup>22</sup> Hal ini dibuktikan dalam hasil penelitian uji MTT dan uji flow cytometry pada Tabel 1 dan Tabel 2, kelompok kontrol positif Doksorubisin menurunkan viabilitas sel lini HSC-3 menjadi 936 sel dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan sekitar 9.762 sel hidup dan kontrol negatif yang menunjukkan sekitar 8.996 sel hidup. Kelompok kontrol positif Doksorubisin menginduksi apoptosis sebesar 77,12 ± 6,06% dari sel yang diuji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang menginduksi apoptosis sebanyak 7,33% dan kelompok tanpa perlakuan yang menunjukkan 4,65% persentase sel apoptosis.

Uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa Doksorubisin 1 µM lebih efektif dalam menurunkan viabilitas sel dan menginduksi apoptosis dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif etanol 70% ( $p=0,004$  dan  $p=0,000 < 0,05$ ; ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif Doksorubisin 1 µM dengan kelompok kontrol negatif etanol 70%) dan kelompok tanpa perlakuan ( $p=0,004$  dan  $p=0,000 < 0,05$ ; ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif Doksorubisin 1 µM dengan kelompok tanpa perlakuan).

Penelitian ini menggunakan uji MTT karena uji MTT telah digunakan secara luas dan populer di laboratorium akademik sebagaimana dibuktikan oleh ribuan artikel yang telah diterbitkan, dan uji MTT tidak menyebabkan pengukuran viabilitas sel yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dalam screening sitotoksitas bahan pengisi saluran akar, karena sebagian besar hasil pengujian sesuai dengan yang diperoleh dari uji viabilitas lainnya.<sup>23</sup> Hasil dari uji MTT adalah densitas optik yang ditentukan dari warna larutan yang diuji, semakin gelap warna yang dihasilkan, semakin besar jumlah sel yang aktif secara metabolik yang berarti semakin tinggi viabilitas sel yang diuji.<sup>24</sup>

Penelitian ini menggunakan flow cytometry untuk mendeteksi apoptosis dan dilanjutkan dengan analisis sub G1 untuk menghitung persentase apoptosis yang terjadi. Menurut data penelitian pada Tabel 2, didapat persentase sel apoptosis pada kelompok perlakuan dengan ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL sebesar 8,33 ± 0,93% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji; 16,55 ± 1,51% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji; dan 28,73 ± 0,89% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji secara berurutan; sebesar 4,65 ± 0,27% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok tanpa perlakuan; sebesar 7,33 ± 0,22% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok kontrol negatif etanol, dan sebesar 77,12 ± 6,06% sel yang mengalami apoptosis dari keseluruhan populasi sel yang diuji pada kelompok kontrol positif.

Berdasarkan hasil uji statistik yang dilakukan pada kedua data hasil MTT dan flow cytometry dapat disimpulkan bahwa semakin banyak jumlah ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. yang digunakan maka semakin rendah viabilitas sel lini HSC-3 dan ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. mulai efektif dalam menginduksi apoptosis dari konsentrasi minimal 10 µg/mL dan mengalami peningkatan pada penggunaan konsentrasi 100 µg/mL dalam waktu paparan ekstrak selama 24 jam.

Berdasarkan penelitian mengenai ekstrak *G. gnemon* L. dan Gnetin C pada beberapa sel kanker, ekstrak *G. gnemon* L. memiliki IC50 terhadap beberapa sel kanker seperti isi pada Tabel 4.14 Tabel 4 berisikan beberapa sel kanker dari penelitian yang sudah pernah dilakukan.

Tabel 4. IC50 ekstrak biji *G. gnemon* L. terhadap proliferasi sel kanker.<sup>14</sup>

Sel Lini	Deskripsi	Ekstrak Biji <i>G. gnemon</i> L. (µg/mL) (Rerata)
PANC-1	Sel kanker pankreas manusia	61,27 ± 2,58
AsPC-1	Sel kanker pankreas manusia	53,74 ± 3,2
PC-3	Sel kanker prostat manusia (AR negatif, tidak tergantung androgen)	38,26 ± 0,24
LNCaP	Sel kanker prostat manusia (AR positif, tergantung androgen)	34,26 ± 0,11
MCF-7	Sel kanker payudara manusia	37,3 ± 0,9
HT-29	Sel kanker usus besar manusia	39,33 ± 4,9
Colon-26	Sel kanker usus besar mencit	36,3 ± 4,9
HEK-293T	Sel epitel ginjal embrio manusia	87,37 ± 2,34

\*Jumlah IC50 dari ekstrak biji *G. gnemon* L. secara signifikan lebih tinggi di sel epitel normal dibandingkan dengan sel kanker

Berdasarkan tabel diatas, perlu dilakukan perhitungan IC50 pada ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. pada sel lini HSC-3 sebagai pembandingan dengan IC50 ekstrak biji *G. gnemon* L. pada sel lini lain. Perhitungan dilakukan dengan mengambil data perlakuan dengan



ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dari hasil uji MTT dengan jumlah sel dan membuat persamaan dengan analisis regresi linier sederhana untuk menemukan konsentrasi minimum untuk menghambat setengah populasi sel kanker HSC-3. Didapatkan hasil IC50 atau konsentrasi minimum untuk menghambat setengah populasi sel dari ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. terhadap sel lini HSC-3 dengan waktu paparan ekstrak selama 24 jam sebesar 55,59 µg/mL.

Klasifikasi aktivitas antikanker berdasarkan nilai IC50 adalah: nilai IC50 ≤ 20 µg/mL tergolong kuat, nilai IC50 21 - 200 µg/mL tergolong sedang, nilai IC50 201 - 500 µg/mL tergolong lemah, dan nilai IC50 > 500 µg/mL tergolong non-sitotoksik. Nilai IC50 ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. tergolong memiliki tingkat sitotoksik sedang.

Berikut adalah nilai IC50 dari ekstrak tanaman lain sebagai pembandingan nilai IC50: *Punica granatum* L. dalam bentuk Pomegranate Extract sebesar 80,53 µg/mL pada sel lini Ca9-22 dalam waktu paparan 24 jam; 100,34 µg/mL pada sel lini HSC-3 dalam waktu paparan 24 jam; 108,12 µg/mL pada sel lini OC-2 dalam waktu paparan 24 jam; 26 dan ekstrak methanol *Myrmecodia pendens* (M. pendens) memiliki IC50 sebesar 5 mg/mL atau sebesar 5000 µg/mL pada sel lini HSC-3 dengan waktu paparan ekstrak selama 24 jam.<sup>27</sup>

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dapat menurunkan viabilitas sel dan menginduksi apoptosis, dengan konsentrasi 10 µg/mL dan 100 µg/mL sebagai konsentrasi efektif yang dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3.

Penelitian ini didukung oleh penelitian efek antikanker ekstrak biji *G. gnemon* L. lainnya.<sup>14,28</sup> Kandungan alkaloid yang terdapat paling tinggi dalam *G. gnemon* L. juga dapat menjadi alasan mengapa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis sel lini HSC-3.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. secara signifikan dapat menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3. Ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. dengan konsentrasi 10 µg/mL sebagai konsentrasi minimal yang efektif untuk menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada sel lini HSC-3 secara signifikan dalam waktu paparan 24 jam.

Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak etanol biji *G. gnemon* L. terhadap sel kanker lain, agar membantu pengembangan obat yang selektif menurunkan dan menginduksi apoptosis pada sel kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Rivera C. Essentials of oral cancer. Edisi ke-8. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Sep 1;8(9):11884-94.
- Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249
- Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. J Cancer Ther. 2012; 3 (4): 263-8.
- Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. Front Pharmacol. 2018;9:1300.
- Chan HK, Ismail S. Side Effects of Chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: Experiences, Perceptions and Informational needs from Clinical Pharmacists. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(13):5305-9

- PingLei C. Cancer- and Chemotherapy-Related Symptoms and the Use of Complementary and Alternative Medicine. Asia Pac J Oncol Nurs. 2019 Maret; 6(1): 4.
- Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, et al. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Bagian 2: Review Study. Edisi ke-22. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. SAGE Publications Ltd; 2017 Oktober. hlm. 982-95.
- Rayan A, Raiyn J, Falah M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. PLoS One. 2017;12(11):e0187925.
- Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, et al. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of Cucurbita pepo and Solanum nigrum on HepG2 and CT26 cancer cell lines. Pharmacogn Mag. 2010;6(23):176-9.
- Husununnisa, Ismed F, Taher M, et al. Screening of some Sumatran medicinal plants and selected secondary metabolites for their cytotoxic potential against MCF-7 and HSC-3 cell lines. J Res Pharm. 2019;23 (4):770-6.
- Yu FS, Yang JS, Yu CS, et al. Saflrole induces apoptosis in human oral cancer HSC-3 cells. J Dent Res. 2011;90(2): 168-74.
- Konno H, Kanai Y, Katagiri M., et al. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Seed Extract Decreases Serum Uric Acid Levels in Nonobese Japanese Males: A Randomized Controlled Study. Evidence-Based Complement Alternat Med. 2013;2013:589169.
- Sari NK, Soemardji AA, Fidrianny I. The Effect of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Leaves and Melinjo Peel Extracts on Induced-Hyperuricemia Male Rats Model. J Med Heal. 2019; 2(4):956-64.
- Narayanan NK, Kunimasa K, Yamori Y, et al. Antitumor activity of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract in human and murine tumor models in vitro and in a colon-26 tumor-bearing mouse model in vivo. Cancer Med. 2015 November; 4 (11): 1767-80.
- Gautam G. General principles of MTT assay method. 2018 November; 4-6. Available from [https://www.researchgate.net/publication/329167834\\_General\\_principles\\_of\\_MTT\\_assay\\_method](https://www.researchgate.net/publication/329167834_General_principles_of_MTT_assay_method)
- McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5.1.1-5.1.11
- Murad H, Hawat M, Ekhtiar A, et al. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. Cancer Cell Int. 2016;16:39.
- Kardela W, Fauziah F, Mayesri S. Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.): Aktivitas Sebagai Antidiare. J Fam Higea. 2018; 10(1):49-56.
- Ruano P, Delgado LL, Picco S, Villegas L, Tonelli F, Merlo M, et al. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. Intech. 2016 Juni; 13.
- Saracevic A, Simundic A, Dukic L. The stability of ethanol in unstoppered tubes. Clin Biochem. 2014;47(1-2): 92-5.
- Fan H, Li H, Liu G, et al. Doxorubicin combined with low intensity ultrasound suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):1-13.
- Schulmeister L. Doxorubicin. Clin J Oncol Nurs. 1998;2(3):115-6
- Pintor AVB, Queiroz LD, Barcelos R, et al. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. Int Endod J. 2020;53(10):1348-73.
- Markonssian S. Assag Guidance Manual [internet]. Bethesda MD: Eli Lilly & Co and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- Geran R, Greenberg N, Macdonald M, et al. Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products against Animal Tumors and Other Biological Systems. Cancer Chemother Reports. 1972;13:1-87.
- Peng SY, Lin LC, Chen SR, et al. Pomegranate extract (Pomx) induces mitochondrial dysfunction and apoptosis of oral cancer cells. Antioxidants. 2021;10 (7):1117.
- Irfanita N, Eddie S, Aziz NA. Preliminary investigations of anticancer properties of *Myrmecodia Pendens* on human oral cancer HSC-3 cell lines. Mater Today Proc. 2019; 16: 2197-203.
- Kumar A, Dholakia K, Sikorska G, Mta1-dependent anticancer activity of gnetin c in prostate cancer. Nutrients. 2019;11(9):2096

# Pengaruh ekstrak biji melinjo terhadap viabilitas dan apoptosis sel hsc-3

## ORIGINALITY REPORT

18%

SIMILARITY INDEX

16%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://www.repository.trisakti.ac.id">www.repository.trisakti.ac.id</a> Internet Source	4%
2	<a href="http://trijurnal.trisakti.ac.id">trijurnal.trisakti.ac.id</a> Internet Source	3%
3	<a href="http://adoc.pub">adoc.pub</a> Internet Source	1%
4	Ernie Halimatushadyah, Muhammad Da'i, Muhammad Nursid. "Sitotoksisitas dan Induksi Apoptosis Ekstrak Etanol Teripang holothuria atra Jaeger, 1833 pada beberapa Sel Kanker", Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, 2018 Publication	1%
5	<a href="http://eprints.ums.ac.id">eprints.ums.ac.id</a> Internet Source	1%
6	<a href="http://repository.its.ac.id">repository.its.ac.id</a> Internet Source	1%
7	<a href="http://jurnal.ugm.ac.id">jurnal.ugm.ac.id</a> Internet Source	1%

8	<a href="http://sctransplant.org">sctransplant.org</a> Internet Source	1 %
9	<a href="http://lipi.go.id">lipi.go.id</a> Internet Source	1 %
10	S. Tugizov, J. Berline, R. Herrera, M. E. Penaranda, M. Nakagawa, J. Palefsky. "Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 E7 Phosphorylation by the S100 MRP-8/14 Protein Complex", Journal of Virology, 2004 Publication	<1 %
11	<a href="http://download.garuda.ristekdikti.go.id">download.garuda.ristekdikti.go.id</a> Internet Source	<1 %
12	<a href="http://www.semanticscholar.org">www.semanticscholar.org</a> Internet Source	<1 %
13	Bailón Moscoso Natalia Catalina. "Fitometabolitos aislados de la flora del sur del ecuador con actividad citostática y/o citotóxica y genotóxica", TESIUNAM, 2015 Publication	<1 %
14	Grace Laury Tulung, Widdhi Bodhi, Jainer Pasca Siampa. "UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN PEGAGAN (Centella asiatica (L.) Urban) SEBAGAI ANTIDIABETES TERHADAP TIKUS PUTIH JANTAN (Rattus norvegicus) YANG DIINDUKSI ALOKSAN", PHARMACON, 2021 Publication	<1 %



15	<a href="http://ejournal.unida.gontor.ac.id">ejournal.unida.gontor.ac.id</a> Internet Source	<1 %
16	<a href="http://id.123dok.com">id.123dok.com</a> Internet Source	<1 %
17	<a href="http://garuda.ristekbrin.go.id">garuda.ristekbrin.go.id</a> Internet Source	<1 %
18	<a href="http://www.centerchem.com">www.centerchem.com</a> Internet Source	<1 %
19	Beatriks Lahamendu, Widdhi Bodhi, Jainer P. Siampa. "UJI EFEK ANALGETIK EKSTRAK ETANOL RIMPANG JAHE PUTIH (Zingiber officinale Rosc.var. Amarum) PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (Rattus norvegicus)", PHARMACON, 2019 Publication	<1 %
20	<a href="http://artikelkesehatananak.com">artikelkesehatananak.com</a> Internet Source	<1 %
21	<a href="http://e-journal.undikma.ac.id">e-journal.undikma.ac.id</a> Internet Source	<1 %
22	<a href="http://ebin.pub">ebin.pub</a> Internet Source	<1 %
23	<a href="http://eprints.uns.ac.id">eprints.uns.ac.id</a> Internet Source	<1 %
24	<a href="http://id.berita.yahoo.com">id.berita.yahoo.com</a> Internet Source	<1 %

25

repositorio.ufpe.br

Internet Source

<1 %

---

26

repository.akfarsam.ac.id

Internet Source

<1 %

---

27

lib.ibs.ac.id

Internet Source

<1 %

---

28

repository.ub.ac.id

Internet Source

<1 %

---

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On