

Ekstrak Etanol Kulit Delima (*Punica Granatum*) dalam Menghambat Proliferasi Sel HeLa

Ethanol Extract of Pomegranate Peel (Punica Granatum) in Inhibiting HeLa Cell Proliferation

¹Latifah Rahman Nurfazriah, ²Diah Dhianawaty, ³Andri Rezano, ⁴Ludovicus Edwinanto

¹Program Studi, Gizi, Universitas Negeri Medan

²Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

⁴Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Maranatha Bandung

ARTIKEL INFO

Article history

Received :01-01-2024

Accepted :29-02-2024

Keywords :

Cervical Cancer, Pomegranate Skin, Cell Proliferation

Kata Kunci :

Kanker serviks, Kulit Delima, Proliferasi sel

Correspondence :

Latifah Rahman Nurfazriah

Email:

latifahnurfazriah1@gmail.com

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the causes of death in women in Indonesia. Many studies have been conducted to determine the anti-cancer effects of natural ingredients. Pomegranate peel contains ellagic acid which has anti-cancer effects. In this study, the anti-cancer activity of pomegranate peel was examined against HeLa cell lines. Pomegranate peel was obtained from Malang, East Java, extracted using 70% ethanol. Cell viability and IC50 values were examined using the MTT test after incubation for 24, 48, and 72 hours. The percentage of living cells was calculated using a hemocytometer using Trypan Blue staining. DNA fragmentation was examined using electrophoresis as a marker of apoptosis activation. The IC50 value in pomegranate peel extract was at a concentration of 450 µg/ml. The results of the percentage of viability cells using hemocytometer at an IC50 concentration of 52%. Smears in DNA fragmentation examination were seen in samples incubated for 24 hours, indicating apoptosis activation. Pomegranate peel extract has anticancer activity against HeLa cell lines, with a mechanism involving apoptosis. This potential indicates that pomegranate peel extract can be further developed as a natural anticancer agent

ABSTRAK

Kanker serviks adalah salah satu penyebab kematian pada wanita di Indonesia. Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui efek anti kanker dari bahan alam. Kulit buah delima mengandung asam ellagik yang memiliki efek anti kanker. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan aktivitas anti kanker dari kulit delima terhadap sel lini HeLa. Kulit delima didapatkan dari Malang, Jawa Timur di ekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Nilai viabilitas sel dan nilai IC50 diperiksa dengan menggunakan uji MTT setelah diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam. Persentase sel hidup dihitung dengan menggunakan hemocytometer dengan menggunakan pewarnaan Trypan Blue. Fragmentasi DNA yang diperiksa menggunakan elektroforesis sebagai penanda aktivasi apoptosis. Nilai IC50 pada ekstrak kulit delima berada pada konsentrasi 450 µg/ml. Hasil persentase sel viabilitas dengan menggunakan hemocytometer pada konsentrasi nilai IC50 sebesar 52%. Smear pada pemeriksaan fragmentasi DNA terlihat pada sampel yang diinkubasi selama 24 jam, menunjukkan aktivasi apoptosis. Ekstrak kulit delima memiliki aktivitas antikanker terhadap sel lini HeLa, dengan mekanisme yang melibatkan apoptosis. Potensi ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit delima dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antikanker alami.

PENDAHULUAN

Metode pengobatan kanker pada saat ini terus berkembang, terdapat peningkatan cepat dalam insiden dan kematian akibat kanker di seluruh dunia. Kanker masih menjadi penyebab kematian utama kedua didunia dengan 9,96 juta kematian pada tahun 2020. Kanker serviks pada Wanita, kanker payudara, dan hati masing-masing menenmpati urutan peratama, ketujuh, dan kesembilan di antara 36 jenis kanker yang paling sering didiagnosis, dengan angka kejadian masing-masing 3,1%, 11,7%, dan 4,7% (1). Kanker serviks adalah keganasan yang umum dan telah menempati peringkat kedua sebagai penyebab kematian terkait kanker pada Wanita (2), dan sekitar 52.900 kasus baru dan 275.000 kematian setiap tahunnya (3). Meskipun ada peningkatan dalam strategi pencegahan, diagnosis, dan terapi, tingkat kelangsungan hidup lima tahun untuk pasien dengan stadium lanjut tetap rendah, yaitu

sekitar 40%, yang menyebabkan banyak kematian terkait kanker. Oleh karena itu, strategi baru untuk pengobatan kanker serviks sangat diperlukan.

Sebagian besar kasus kanker serviks disebabkan oleh infeksi HPV berisiko tinggi yang menyebabkan kerusakan DNA; namun, studi terbaru menemukan bahwa stres oksidatif juga terlibat dalam efek ini (4). Stres oksidatif terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara produksi oksigen reaktif (ROS) dan efektivitas sistem antioksidan dalam mengatasi kerusakan. Ketidakseimbangan ini telah diteliti pada pasien kanker, bahkan sebelum memulai pengobatan apapun (5). Menurut National Cancer Institute, saat ini ada berbagai pengobatan terhadap neoplasma ganas, seperti kemoterapi, radioterapi, pembedahan untuk pengangkatan, imunoterapi, dan terapi hormonal (5). Namun, tidak semua pasien memenuhi syarat untuk pengobatan ini dan biasanya diperlukan kombinasi 2 atau lebih terapi, yang dapat memiliki efek samping serius pada tubuh dan sistem kekebalan pasien (6). Selain itu, terapi konvensional ini meningkatkan pembentukan ROS (Reactive Oxygen Species), yang dapat menyebabkan efek samping toksik pada jaringan sehat. Masalah ini telah mendorong para dokter dan peneliti untuk mengembangkan pengobatan baru yang mungkin untuk patologi ini. Salah satu yang paling menjanjikan adalah penggunaan polifenol alami untuk pengembangan obat antikanker (7).

Polifenol makanan ditemukan terutama dalam makanan asal tumbuhan, seperti buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, teh hijau, kopi, dan lainnya (8). Delima (*Punica granatum L.*) adalah buah yang banyak dikonsumsi dan berasal dari pohon dengan nama yang sama dari keluarga Lythraceae. Buah beri ini merupakan sumber yang sangat baik dari fitokimia yang memiliki efek antioksidan dan anti-inflamasi yang kuat (9). Kulit delima adalah bagian buah yang tidak dapat dimakan dan dianggap sebagai limbah industri. Namun, produk sampingan ini mewakili lebih dari 40% dari total berat delima dan mengandung banyak senyawa polifenolik dengan tingkat yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang ditemukan pada jus dan bijinya (10).

Asam ellagik dapat menginduksi apoptosis pada karsinoma melalui jalur PI3K/Akt dengan meningkatkan ekspresi PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) dalam disfosforilasi PIP3 yang menyebabkan inaktivasi PI3K, memodulasi Bcl-2 yang terlibat dalam jalur intrinsik apoptosis, meningkatkan ekspresi Bax, dan aktivasi caspase-3 dengan meningkatkan siklotochrome c sehingga menyebabkan kematian sel. PI3K/Akt adalah jalur intraseluler yang mengatur siklus sel. Aktivasi PI3K dapat memfosforilasi dan mengaktifkan Akt, yang terdapat di membran plasma. Pada kanker, jalur ini selalu aktif, sehingga dapat menghambat apoptosis yang mengakibatkan proliferasi yang terus-menerus (11).

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa polifenol yang terdapat dalam ekstrak kulit delima memiliki aktivitas antiproliferasi dan antitumor pada berbagai jenis sel kanker (12) (13). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi mekanisme molekuler yang terlibat dalam efek antikanker dari senyawa polifenolik yang terdapat dalam kulit delima pada sel kanker servik (HeLa).

METODE

Ekstraksi Kulit Delima dan Etoposid

Kulit delima diambil dari Malang, Jawa Timur. Ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 70% dan dikonsentrasikan menggunakan *freeze dryer* untuk memperoleh ekstrak terkonsentrasi. Etoposid diperoleh dari Calbiochem, San Diego, CA. Larutan DMSO (Sigma Aldrich, Jerman), Kulit delima digunakan untuk percobaan *in vitro* dengan mencairkan konsentrasi yang sesuai. Etoposid dilarutkan dalam media kultur sebagai kontrol positif. Konsentrasi akhir DMSO diatur kurang dari 1%.

Pertumbuhan Sel HeLa

Sel lini kanker serviks HeLa dikultur menggunakan medium phenol red RPMI dengan suplementasi Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, serta antibiotik streptomisin 10 µg/ml, dan penisilin 100 U/ml kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 50%, dengan suhu 37°C. Kultur sel yang digunakan adalah kultur dengan luas area tumbuh 70-80% konfluens (log phase).

MTT Assay

Sel yang berada dalam setiap *well* diinkubasi dengan menggunakan HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) yang mengandung 1 mg/ml *MTT* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) selama 4 jam pada suhu 37°C didalam inkubator CO₂ 5%. Selanjutnya larutan *MTT* dibuang dan 50 µl *isopropanol* dimasukkan ke dalam

setiap *well* untuk melarutkan kristal formazan. Plate digerakkan (agitasi) selama 5 menit pada suhu ruangan sampai larutan tercampur dengan sempurna. Tingkatan derivat formazan yang berwarna, kemudian dianalisis menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm. Indeks proliferasi sel digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ setelah perlakuan sel. Etoposid 50 μ M digunakan sebagai agen sitotoksik standar berdasarkan laporan sebelumnya (14).

Perhitungan sel dengan menggunakan *Trypan Blue Staining*

Sel dikultur di dalam cawan petri 6 cm lalu diinkubasi selama 24 jam dengan dan tanpa penambahan ekstrak etanol kulit delima. Setelah diinkubasi, medium dibuang selanjutnya sel dicuci dengan menggunakan PBS. Lalu ditetesi 2 ml trypsin hingga sel terlepas dari dasar cawan petri. Sel disentrifugasi dan dicuci dengan PBS kembali. Sel dihomogenisasi dengan menggunakan pipet dan sampel sel diambil, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop cahaya dengan pewarnaan trypan blue menggunakan hemositometer (15)

Pengambilan Gambar Morfologis Sel

Sel yang dikultur di dalam cawan petri 6 cm dan diinkubasi selama 24 jam dengan dan tanpa penambahan ekstrak etanol kulit delima. Cawan petri diperiksa di bawah mikroskop cahaya dan dilihat gambaran morfologi dari setiap cawan petri lalu didokumentasikan.

Fragmentasi DNA

Sel didalam PBS disentrifugasi hingga terbentuk cell pellets. Cell pellets diinkubasi dengan larutan 200 μ l buffer AL dalam QIAamp mini spin column yang terdapat didalam QIAamp DNA Mini Kit lalu vortex selama 15 detik. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 56°C lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Teteskan 200 μ l etanol 96% dan di 36 vortex kembali selama 15 menit dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Mini spin column dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan ditetesi 500 μ l buffer AW1 lalu disentrifugasi 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Pindahkan kembali mini spin column kedalam tabung eppendorf yang baru, lalu teteskan 500 μ l buffer AW2 dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Mini spin column yang telah berisi DNA diambil dari dalam tabung eppendorf. Kemudian konsentrasi DNA diperiksa dengan menggunakan Nannogram. Siapkan Gel agarose 1,5%, kemudian sebanyak 100 ng masing-masing sampel DNA dicampur dengan ethidium bromide lalu dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran gel agarose. Tahap selanjutnya dilakukan elektroforesis dalam 100 V selama 1 jam. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan gel doc dan didokumentasikan.(16)

Pemeriksaan Rasio Bax/Bcl-2 menggunakan *One Step PCR*

Untuk ekstraksi RNA, sampel dicairkan dan dicuci dengan *phosphate-buffered saline* (PBS). RNA total diekstraksi menggunakan *Direct-Zol RNA Mini Prep Plus* (Zymo Research, California, USA) sesuai dengan petunjuk dari produsen. Sel-sel kemudian dilarutkan menggunakan *Tri Reagent*® dan dihomogenisasi, lalu dilanjutkan dengan pemurnian RNA, sesuai dengan petunjuk produsen. RNA diukur menggunakan spektrofotometer (rasio absorbansi dibaca pada 260/280 nm > 1,8). RNA kemudian dianalisis melalui PCR kuantitatif dan dianalisis menggunakan metode Livak dengan rumus $2^{-\Delta\Delta CT}$ (17)

Primer yang digunakan adalah sebagai berikut:

Bax F : TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC

R : TCA CCC AAC CAC CCT CGT CTT

Bcl-2 F : TCG CCC TGT GGA TGA CTG A

R : CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC A

GAPDH F : TTT GGC TAC AGC AAC AGG

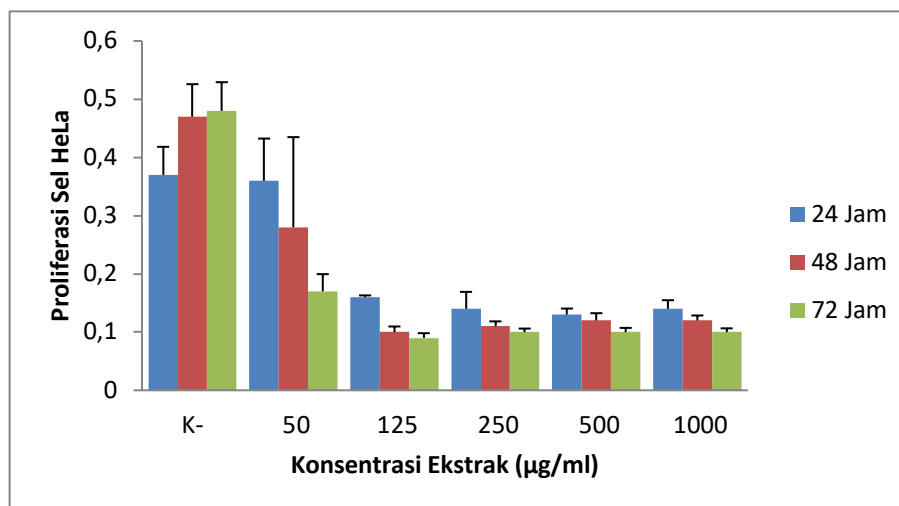
R : GGT CTC TCT CTT CCT CCT G

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Ekstrak Etanol Kulit Delima Terhadap Proliferasi Sel

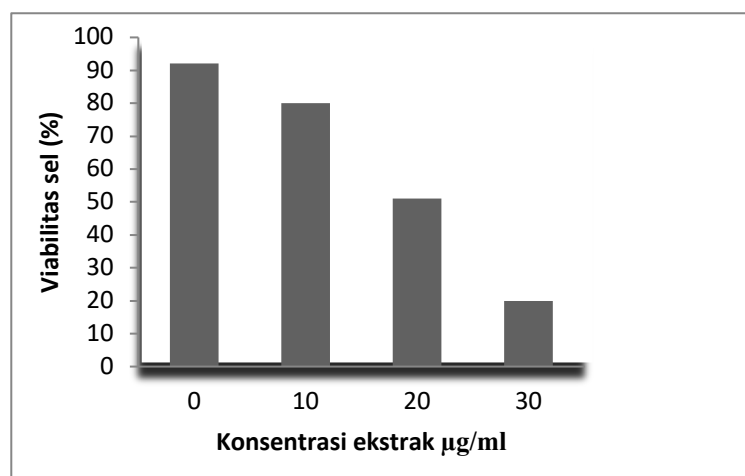
Pemeriksaan MTT adalah uji proliferasi untuk menilai efek dari ekstrak etanol kulit delima (*Punica granatum*) terhadap sel HeLa. Persentase penghambatan pertumbuhan sel dihitung dengan rumus berikut: % penghambatan pertumbuhan sel = $100 - \{(\text{Nilai absorbansi senyawa uji} - \text{Nilai absorbansi blanko}) / (\text{Nilai absorbansi kontrol} - \text{Nilai absorbansi blanko})\} \times 100$.



Gambar 1. Grafik proliferasi sel HeLa dengan perlakuan ekstrak etanol kulit delima 24, 48, dan 72 jam.

Indeks proliferasi sel bervariasi dari konsentrasi 50 µg/ml hingga 1000 µg/ml. Jumlah indeks proliferasi sel digunakan untuk menghitung IC₅₀ dengan persamaan logaritma. Pada konsentrasi 20 µg/ml, ekstrak ini mampu menghambat proliferasi sel HeLa hingga 50%.

Uji sitotoksitas menggunakan MTT selanjutnya dikonfirmasi dengan pemeriksaan pewarnaan Trypan Blue menggunakan hemositometer. sel yang mati akan berwarna dan terlihat sel berwarna biru hal ini dikarenakan membran sel yang menjadi permeable sehingga memungkinkan warna masuk ke dalam sel. Pada sel yang masih hidup, membran akan terlihat impermeable sehingga warna tidak dapat masuk ke dalam sel, maka sel akan terlihat terang. Persentase jumlah sel yang mati adalah 49% pada konsentrasi ekstrak 20 µg/ml, jumlah ini sama dengan persentase sel hidup yang diperoleh pada kontrol positif sebesar 56%.



Gambar 2. Diagram viabilitas sel berdasarkan hitung sel dengan pewarnaan trypan blue setelah inkubasi 24 jam

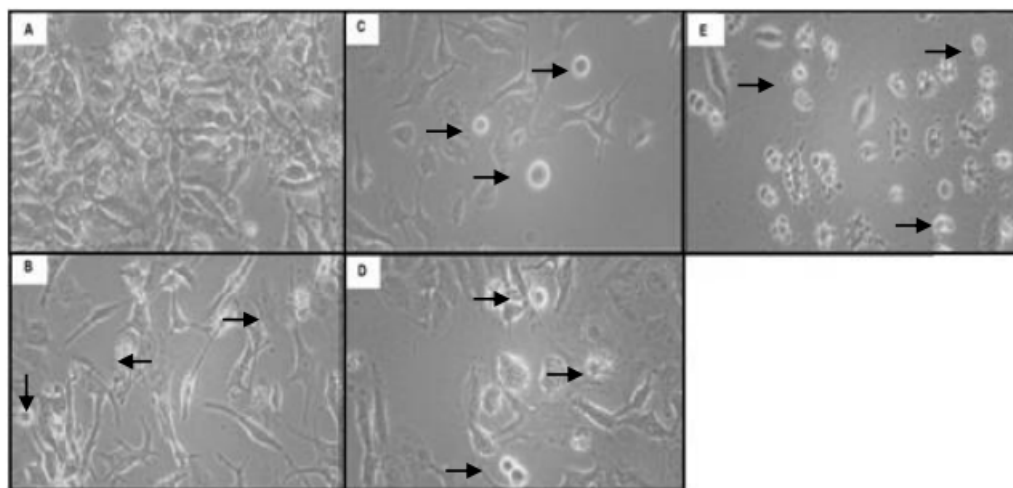
Viabilitas sel semakin menurun seiring dengan semakin besarnya konsentrasi pada ekstrak yang diberikan. Dengan demikian, semakin besar konsentrasi pada ekstrak yang diberikan, maka semakin banyak pula sel yang mengalami kematian. Sehingga hal ini menunjukkan adanya efek antiproliferasi dari ekstrak etanol kulit delima terhadap sel HeLa. Hal ini sejalan dengan penelitian Ellithy et al, (2014) yang menyatakan bahwa nilai IC₅₀ di bawah 100 µg/ml menunjukkan suatu ekstrak tersebut memiliki potensi antikanker. Ekstrak yang berpotensi sebagai antikanker diklasifikasikan dalam tiga tingkatan, yaitu kuat (IC₅₀ ≤20), sedang (IC₅₀ ≤49), dan lemah (IC₅₀ ≥50). Ekstrak kulit delima berpotensi sebagai antikanker dan memiliki efek yang kuat terhadap sel HeLa.

Pemeriksaan Scrining Fitokimia

Evaluasi fitokimia ekstrak etanol kulit delima menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tanin, Quinon, saponin, dan triterpenoid/steroid.

Gambaran Morfologi Sel HeLa

Pada sel yang mengalami apoptosis dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya maupun dengan mikroskop electron. Perubahan morfologi pada ekstrak kilut delima ditunjukkan pada (Gambar 3).



Gambar 3. Gambar morfologi HeLa. Keterangan (a). kontrol negatif (K-) yang tidak diberikan perlakuan, (b) kontrol positif (K+) yang diberikan etoposid 3 µM, (c) perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 10 µg / ml, (d) perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 20 µg / ml yang termasuk IC₅₀, dan (e) perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 30 µg / ml, dengan pembesaran 100x

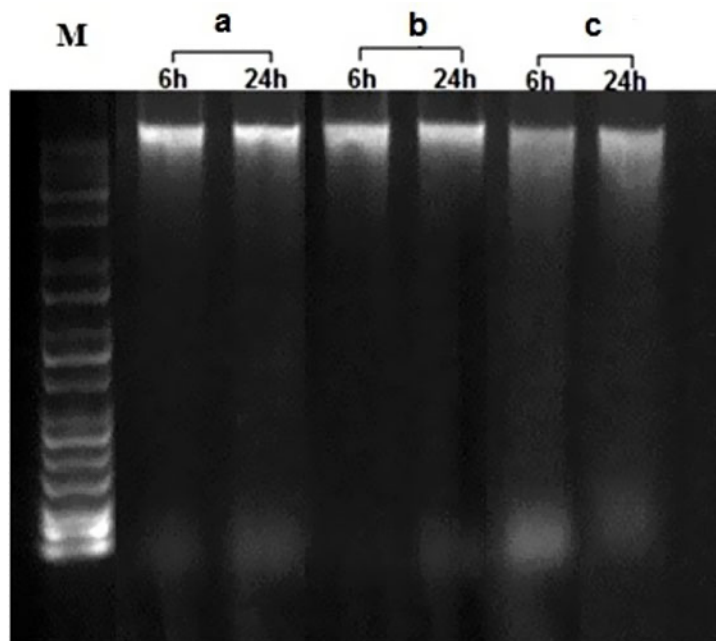
Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel HeLa yang diberikan ekstrak kulit delima dengan konsentrasi 20 µg/ml selama 24 jam mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis terlihat lebih gelap, sel mengambang (tidak menempel pada plate), dan terlihat membulat. Sedangkan sel yang masih hidup sel masih intact dan menempel (kontrol). Sel yang mengalami perubahan morfologis ditunjukkan oleh anak panah berwarna hitam.

Jumlah kematian sel semakin bertambah sesuai dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Pada konsentrasi 20 µg/ml sebagian sel mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 30 µg/ml hampir tidak dapat ditemukan lagi sel yang masih viable.

Pemeriksaan Fragmentasi DNA

Penurunan jumlah viabilitas sel dikaitkan dengan apoptosis. Ekstrak kulit delima dapat mengalami apoptosis pada sel HeLa. Fragmentasi DNA dianggap sebagai ciri khas apoptosis. Pola fragmentasi DNA yang khas diamati pada sel yang diberi ekstrak kulit delima dengan waktu inkubasi yang berbeda yaitu 6 jam dan 24 jam (Gambar 4).

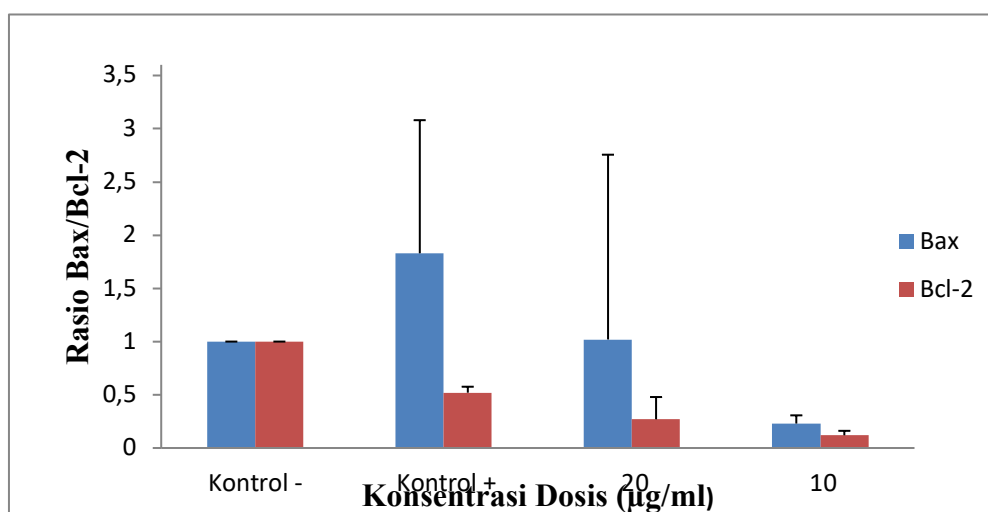
Pada inkubasi 6 jam, terlihat adanya smear pada semua sampel kecuali pada kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa proses apoptosis telah dimulai pada 6 jam awal setelah diberikan perlakuan. Dan pada 24 jam, DNA telah rusak lebih oleh fragmen yang lebih pendek, sehingga ketika elektroforesis diberikan, fragmen akan keluar dari gel agarose. Degradasi DNA terjadi akibat aktivasi protein caspase 3 dalam proses apoptosis. Terjadinya fragmentasi DNA merupakan suatu proses yang dapat mengindikasikan protein caspase 3 sebagai efektor apoptosis telah aktif.



Gambar 4. Efek ekstrak PP pada Fragmentasi DNA sel HeLa. Sel-sel tersebut diperlakukan dengan ekstrak PP dengan konsentrasi yang berbeda dan inkubasi yang berbeda. Penanda DNA (M), (a) Medium (kontrol negatif); (b) Etoposide 3 μM (kontrol positif); (c) 20 $\mu\text{g/ml}$, diinkubasi selama 6 dan 24 jam. 100 ng DNA dari setiap sampel digunakan untuk menganalisis fragmentasi DNA, menggunakan gel agarosa 1,5%, 100 V selama 1 jam. Etidium bromida digunakan untuk memvisualisasikan DNA yang terfragmentasi

Pemeriksaan Rasio Bax/Bcl-2

Proses apoptosis terjadi akibat adanya kerusakan DNA dan komponen sel melalui aktivitas caspase. Aktivitas caspase melalui jalur intrinsik diperantarai oleh protein dari kelompok Bcl-2 sebagai regulator apoptosis. Bax merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 merupakan protein anti-apoptosis. Rasio dari Bax dan Bcl-2 merupakan titik penting untuk melihat apakah proses apoptosis akan terjadi atau tidak. Bahkan rasio dari Bax dan Bcl-2 merupakan titik penentu terjadinya apoptosis. Dari hasil analisis dengan menggunakan metode Livak dengan rumus ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$). Pada semua kelompok perlakuan diketahui adanya peningkatan rasio Bax dan penurunan rasio Bcl



Gambar 5. Analisis ekspresi Bax dan Bcl-2 menggunakan qPCR.

Pada kelompok perlakuan peningkatan rasio Bax tertinggi terdapat pada dosis 20 µg/ml yang diinkubasi selama 6 jam yaitu sebanyak 3 kali lebih tinggi dibandingkan dengan rasio Bcl-2. Dari hasil tersebut, maka dapat diketahui bahwa ekstrak etanol kulit delima dapat meningkatkan rasio Bax dan menurunkan rasio Bcl-2 sehingga berpotensi dalam meningkatkan kematian sel melalui jalur intrinsik.

PEMBAHASAN

Proliferasi sel merupakan salah satu karakteristik yang dimiliki oleh setiap makhluk hidup untuk tumbuh, berkembang, dan mempertahankan kehidupannya. Proliferasi terjadi dalam serangkaian proses yang dikenal sebagai siklus sel yang dikontrol oleh dua mekanisme yaitu proses checkpoint dan apoptosis. Komponen yang bekerja dalam proses pengontrolan siklus sel tersebut antara lain gen penekan tumor dan proteosom ubiquitin (18). Pada penelitian (19) menyatakan bahwa ekstrak delima memiliki efek anti-proliferatif dan pro-apoptosis melalui modulasi CDK (Cyclin-dependent kinase) dengan menghambat aktivitas cdk pada sel PC3 yang secara signifikan dapat menurunkan ekspresi dari cyclin D1, D2 dan E dan CDK 2, CDK 4 dan CDK 6 serta p21 dan p16 yang dapat menyebabkan transisi fase G1-S terhambat.

Penelitian ini mengidentifikasi penghambatan proliferasi sel HeLa yang terjadi setelah 24 jam. Proliferasi merupakan suatu proses kompleks yang terdiri dari beberapa tahapan dimana setiap tahapan membutuhkan durasi waktu, seperti pada proses transkripsi, translasi, sampai mekanisme kerja serangkaian protein yang menimbulkan efek metabolik. Berdasarkan teori reseptor terdapat tiga konsep diantaranya : (1) efek obat akan muncul karena adanya interaksi obat dengan reseptor dalam sel; (2) intensitas efek obat berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikat; (3) fraksi reseptor tergantung pada beberapa hal diantaranya adalah dosis dan lama paparan. Semakin lama paparan dan semakin tinggi dosis, maka intensitas efek obat akan semakin meningkat. Konsep ini mendukung temuan pada penelitian ini yaitu penurunan proliferasi terjadi pada pemberian ekstrak yang diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam dan pada dosis tinggi ekstrak etanol kulit delima (20).

Selanjutnya untuk mengidentifikasi sel yang mati digunakan pemeriksaan menggunakan pewarnaan trypan blue. Pemeriksaan ini didasarkan pada permeabilitas membran, dengan asumsi bahwa sel yang memiliki membran yang 48 permeabel telah mengalami kerusakan yang ireversibel yang artinya sel mati. Sel yang mati akan menyerap warna biru sehingga dengan pemeriksaan mikroskopis akan tampak biru dengan inti berwarna lebih gelap. Pada penelitian ini ekstrak kulit delima menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel HeLa yang di pengaruhi oleh dosis. Pada konsentrasi ekstrak etanol kulit delima tertinggi menyebabkan kematian sel yang lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak etanol kulit delima yang rendah. Dari hasil perhitungan didapatkan persentase viabilitas sel pada kontrol positif sebanyak 56%, sedangkan pada konsentrasi IC₅₀ (20 µg/ml) sebanyak 49% dan pada konsentrasi tertinggi 30 µg/ml sebanyak 20%. Hal ini menunjukkan efek sinergis dari ekstrak kulit delima dengan etoposide dalam menginduksi kematian sel (20).

Apoptosis merupakan salah satu kejadian yang memiliki peran penting dalam pengaturan aktivitas seluler pada organisme eukariotik. Sel yang mengalami kematian melalui proses apoptosis akan mengalami perubahan morfologis seperti terjadi kondensasi kromatin dan sitoplasma, membran blebbing, fragmentasi DNA, pembentukan apoptotic bodies, dan pemaparan fosfatidilserin ke bagian luar membran sel (21). Pada penelitian ini sel yang mengalami apoptosis dapat digambarkan dengan adanya perubahan bentuk morfologi yang membulat pada kultur sel HeLa. Sel HeLa mulai mengalami apoptosis pada perlakuan ekstrak kulit delima yang diinkubasi selama 24 jam pertama. Mekanisme apoptosis melibatkan beberapa faktor yaitu melibatkan aktivitas enzim endonuklease yang diinduksi oleh pertambahan ion kalsium sitotoksik akan menyebabkan fragmentasi DNA. Pada keadaan normal, di dalam sel sudah tersedia enzim CAD (caspase-3 activated DNase), Namun enzim tersebut masih inaktif karena terikat pada inhibitornya, yaitu ICAD. Jika ada sinyal apoptosis caspase 3 akan teraktivasi dan akan memotong ikatan antara CAD dan ICAD, sehingga CAD akan teraktivasi dan dapat memotong DNA menjadi fragmen-fragmen (22).

Adanya peningkatan kematian sel pada sel HeLa setelah pemberian ekstrak kulit delima (Gambar 2) menunjukkan terjadinya penekanan pertumbuhan yang di akibatkan oleh induksi apoptosis setelah sel diberikan perlakuan. Transduksi sinyal apoptosis dan eksekusinya memerlukan aktivasi dari caspase. Efek ini dikonfirmasi oleh adanya smear pada fragmentasi DNA yang kontras dengan kelompok kontrol (Gambar 4). Pada waktu inkubasi awal selama 6 jam, terlihat smear pada sel HeLa yang di beri perlakuan, hal menunjukkan adanya aktivitas dari caspase 3.(22)

Apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel, di antaranya melibatkan gen p53, Rb, Myc, dan kelompok Bcl-2. Gangguan regulasi dan proliferasi sel baik aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi gen tumor supresor p53, ada hubungannya dengan kontrol apoptosis (23)

Kanker serviks terjadi akibat p53 pada sel tersebut tidak stabil dan inaktivasi dikarenakan adanya interaksi protein E6 dan E7 HPV. E6 akan mendegradasi p53 sedangkan E7 akan mengikat pRB sehingga mengakibatkan hilangnya kompleks pRB/E2F yang berfungsi dalam menjaga kestabilan genom. Bila ekspresi E6 dan E7 dihambat, maka p53 dan retinoblastoma aktif dan sel kanker serviks akan mengalami senescence yang menyebabkan apoptosis (24). Kulit delima mengandung asam ellagik yang dipercaya dapat menginduksi apoptosis melalui jalur PI3K/Akt dengan memodulasi Bcl-2. Jalur PI3K berperan dalam mengatur fungsi sel seperti pertumbuhan, motilitas, proliferasi, diferensiasi, kelangsungan hidup dan pesan intraseluler. Jika jalur ini bermasalah, akan terjadi disregulasi fungsi sel dapat menyebabkan perkembangan berbagai tipe kanker, termasuk kanker payudara, ovarium, paru dan endometrium. PI3K akan membentuk PIP2 (phosphorylates-4,5-biphosphate) menjadi PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) untuk berikatan dengan Akt di membran plasma dimana Akt difosforilasi di Thr308 oleh PDK1 dan Ser437 oleh mTOR kompleks 2 (mTOR2) (25). Pada penelitian Berdowska (2021), Ekstrak etanol delima dapat menghambat aktivitas PI3K dengan menghambat subunit regulator (p85) dan katalitik (p110) serta menghambat fosforilasi Akt pada Thr308 pada sel kanker paru A549 (26).

PI3K/Akt dapat mentransduksi sinyal dalam mendorong pertumbuhan sel kanker dengan cara menonaktifkan caspase 9 sehingga sel kanker dapat menghindari proses apoptosis. Sebagai alternatif, jika jalur PI3K dihambat maka akan terjadi peningkatan rasio dari Bax untuk menginduksi apoptosis. Lipid fosfatase dan PTEN, juga akan menghambat aktivitas Akt dengan cara disfosforilasi PIP3 (23). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme kerja ekstrak etanol kulit delima dalam menekan pertumbuhan sel kanker dan menginduksi apoptosis adalah melalui jalur mitokondria dengan cara PIP3 disfosforilasi oleh PTEN sehingga PI3K/Akt inaktivasi dan Bax akan terfosforilasi sehingga rasio Bax akan meningkat dan selanjutnya menginduksi apoptosis jalur intrinsik (27). Rasio Bax yang meningkat akan menyebabkan permeabilitas membran mitokondria meningkat sehingga terbentuk porus pada mitokondria yang mengakibatkan sitokrom c keluar dari mitokondria. Selanjutnya sitokrom c akan berikatan dengan Apaf-1 untuk mengaktifkan procaspase 9 dan mengaktifkan caspase 3 untuk melakukan apoptosis. Oleh karena itu Bax/Bcl-2 berperan penting pada penghambatan apoptosis jalur intrinsik yang disebabkan disfungsi dari mitokondria. Ketidakseimbangan antara gen pro-apoptosis dan anti-apoptosis dapat menentukan kestabilan genom (28)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit delima secara signifikan dapat mengurangi viabilitas sel, mengubah morfologi sel, dan menginduksi apoptosis pada sel HeLa. Dari hasil ini juga dapat mengindikasikan bahwa ekstrak etanol kulit delima berpotensi digunakan untuk pencegahan kanker melalui penekanan viabilitas sel dan induksi apoptosis pada sel HeLa. Penelitian ini memberikan skrining awal terhadap aktivitas antikanker ekstrak etanol kulit delima dan subfraksinya, yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen terapeutik antikanker potensial. Penelitian ini memiliki kekurangan, seperti tidak adanya kontrol positif, fokus terbatas pada sel HeLa, pendekatan in vitro, dan belum adanya uji toksisitas terhadap sel normal maupun standar kualitas bahan baku. Untuk pengembangan, disarankan eksplorasi konsentrasi dan durasi inkubasi yang lebih luas, isolasi senyawa aktif, uji in vivo, pendalaman mekanisme molekuler, serta pengembangan formulasi untuk meningkatkan efektivitas dan keamanan ekstrak kulit delima sebagai agen antikanker

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Universitas Negeri Medan dan Universitas Jambi dan semua pihak yang telah berkontribusi dalam penelitian ini baik yang secara langsung maupun tidak langsung,

DAFTAR PUSTAKA

1. Sung H, Ferlay J, Rebecca L. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;209–49.

2. Wu L, Han L, Zhou C, Wei W, Chen X, Yi H, et al. TGF- β 1-induced CK17 enhances cancer stem cell-like properties rather than EMT in promoting cervical cancer metastasis via the ERK1/2-MZF1 signaling pathway. *FEBS Journal*. 2017;284(18):3000–17.
3. Huang L, Huang Z, Fan Y, He L, Ye M, Shi K, et al. FOXC1 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma through the PI3K-AKT signal pathway. *Am J Transl Res* [Internet]. 2017 [cited 2024 Nov 22];9(3):1297. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5376020/>
4. Zahra K, Patel S, Dey T, Pandey U, Mishra SP. A study of oxidative stress in cervical cancer- an institutional study. *Biochem Biophys Rep*. 2021 Mar;25:100881.
5. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Nov 22];17(1):22–8. Available from: https://journals.lww.com/cancerjournal/fulltext/2021/17010/oxidative_stress_and_its_role_in_cancer.4.aspx
6. Schirmacher V. *Journal of Oncology*. 2018 [cited 2024 Nov 22]. p. 407–19 From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). Available from: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/54/2/407>
7. Tabrez S, Jabir NR, Adhami VM, Khan MI, Moulay M, Kamal MA, et al. Nanoencapsulated Dietary Polyphenols for Cancer Prevention and Treatment: Successes and Challenges. *Nanomedicine* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Nov 22];15(11):1147–62. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/nnm-2019-0398>
8. Guasch-Ferré M, Liu X, Malik VS, Sun Q, Willett WC, Manson JAE, et al. Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 Nov 14 [cited 2024 Nov 22];70(20):2519–32. Available from: <https://www.jacc.org/doi/10.1016/j.jacc.2017.09.035>
9. Belgacem I, Li Destri Nicosia MG, Pangallo S, Abdelfattah A, Benuzzi M, Agosteo GE, et al. Pomegranate Peel Extracts as Safe Natural Treatments to Control Plant Diseases and Increase the Shelf-Life and Safety of Fresh Fruits and Vegetables. *Plants* 2021, Vol 10, Page 453 [Internet]. 2021 Feb 27 [cited 2024 Nov 22];10(3):453. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/3/453/htm>
10. Suručić R, Travar M, Petković M, Tubić B, Stojiljković MP, Grabež M, et al. Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor: In silico and in vitro studies. *Bioorg Chem*. 2021 Sep 1;114:105145.
11. Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H, et al. [Retracted] Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Nov 22];2022(1):3848084. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2022/3848084>
12. Deng Y, Li Y, Yang F, Zeng A, Yang S, Luo Y, et al. The extract from Punica granatum (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Sep 1;93:976–84.
13. Ahmadiankia N, Bagheri M, Fazli M. Gene Expression Changes in Pomegranate Peel Extract-Treated Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Rep Biochem Mol Biol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2024 Nov 22];7(1):102. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6175583/>
14. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
15. Piccinini F, Tesi A, Arienti C, Bevilacqua A. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol Proced Online* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2024 Nov 22];19(1):1–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12575-017-0056-3>
16. Abcam. (n.d.). Apoptosis DNA fragmentation analysis protocol. Retrieved [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 19]. Available from: <http://docs.abcam.com/pdf/protocols/apoptosis-dnafragmentation-analysis-protocol.pdf>
17. Schroer J, Warm D, De Rosa F, Luhmann HJ, Sinning A. Activity-dependent regulation of the BAX/BCL-2 pathway protects cortical neurons from apoptotic death during early development. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Nov 22];80(6):1–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-023-04824-6>
18. Cordiano R, Gammeri L, Di Salvo E, Gangemi S, Minciullo PL. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extract Effects on Inflammaging. *Molecules* 2024, Vol 29, Page 4174 [Internet]. 2024 Sep 3 [cited 2024 Nov 22];29(17):4174. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/17/4174/htm>
19. Wang L, Martins-Green M. Pomegranate and Its Components as Alternative Treatment for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, Vol 15, Pages 14949–14966 [Internet]. 2014 Aug 25 [cited 2024 Nov 22];15(9):14949–66. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/9/14949/htm>
20. Zhou Q yuan, Ren C, Li J yan, Wang L, Duan Y, Yao R qi, et al. The crosstalk between mitochondrial quality control and metal-dependent cell death. *Cell Death Dis*. 2024;15(4):299.

21. Vitale I, Pietrocola F, Guilbaud E, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death & Differentiation* 2023 30:5 [Internet]. 2023 Apr 26 [cited 2024 Nov 22];30(5):1097–154. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-023-01153-w>
22. Zhu H, Hao H, Yu L. Identifying disease-related microbes based on multi-scale variational graph autoencoder embedding Wasserstein distance. *BMC Biol* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Nov 22];21(1):1–15. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12915-023-01796-8>
23. Ceci C, Lacal PM, Tentori L, De Martino MG, Miano R, Graziani G. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. *Nutrients* 2018, Vol 10, Page 1756 [Internet]. 2018 Nov 14 [cited 2024 Nov 22];10(11):1756. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1756/html>
24. Hausen H, Barre-sinoussi F, Montagnier L. The Nobel Prize in Physiology or Medicine . Karolinska Institute [Internet]. 2018 [cited 2024 Nov 22]; Available from: <http://www.nobelprize.org>
25. Underwood J. General and Systematic Pathology. Churchill Living stone. 2020;
26. Berdowska I, Matusiewicz M. Cathepsin L, transmembrane peptidase/serine subfamily member 2/4, and other host proteases in COVID-19 pathogenesis – with impact on gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterol.* 2017;27(39):6590–600.
27. Srivastava A, Singla DK. PTEN-AKT pathway attenuates apoptosis and adverse remodeling in ponatinib-induced skeletal muscle toxicity following BMP-7 treatment. *Physiol Rep* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Nov 22];11(6):e15629. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.15629>
28. Li J, Zhong C, Liao Z, Mao L, Li W, Sun M, et al. Bta-miR-98 Suppresses Replication of Caprine Parainfluenza Virus Type 3 Through Inhibiting Apoptosis by Targeting Caspase-3. 2020;11.