

SITOTOKSISITAS EKSTRAK CAMPURAN BUAH SIRIH, PINANG, DAN KAPUR TERHADAP GALUR SEL 3T3

Rahmi Amtha¹, Najla Nadiyah², Felix Wong³, Ferry Sandra⁴

¹ Bagian Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta

Email: rahmi.amtha@trisakti.ac.id

² Bagian Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta

Email: najlanadiyah@yahoo.com

³ Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta

Email: felixwong@gmail.com

⁴ Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta

Email: ferrysandra@trisakti.ac.id

Masuk: 04-06-2021, revisi: 15-12-2021, diterima untuk diterbitkan: 08-02-2022

ABSTRAK

Kebiasaan menyirih telah ditetapkan oleh WHO sebagai salah satu faktor risiko terjadinya kanker mulut dikarenakan adanya bahan karsinogenik yang terkandung dalam campurannya. Menyirih merupakan suatu kebiasaan mengunyah campuran buah sirih, pinang, dan kapur dengan atau tanpa tembakau. Hingga kini menyirih masih menjadi salah satu kebiasaan masyarakat pada beberapa negara di Asia Tenggara termasuk Indonesia. Budaya mengunyah sirih masih cukup tinggi terutama di Indonesia bagian timur. Campuran sirih yang digunakannya dapat bervariasi. Indonesia timur lebih banyak menggunakan buah sirih dibandingkan daun sirih. Penelitian mengenai sitotoksitas campuran buah sirih, pinang dan kapur yang berasal dari NTT Kupang, belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sitotoksitas campuran ekstrak buah sirih, pinang dan kapur terhadap galur sel fibroblast 3T3 serta *Inhibitory Concentration of 50% (IC50)*. Uji sitotoksitas dengan MTT assay dilakukan pada galur sel fibroblast 3T3 terhadap campuran sirih dengan konsentrasi 0, 30, 60 dan 120 µg/mL pada masa inkubasi 24 dan 48 jam. Campuran ekstrak yang menunjukkan sitotoksik paling tinggi pada konsentrasi 120 µg/mL dalam masa inkubasi 48 jam. IC50 ekstrak pada masa inkubasi 24 dan 48 jam adalah 125,21 µg/mL dan 155,06 µg/mL. Campuran ekstrak buah sirih, pinang dan kapur bersifat sitotoksik terhadap galur sel 3T3.

Kata Kunci: sitotoksitas; buah sirih; pinang; kapur; 3T3

ABSTRACT

The habit of betel quid chewing has been determined by the WHO as a risk factor for oral cancer due to the carcinogenic substances contained in the mixture. Betel quid chewing is a habit of chewing a mixture of betel, areca nut, and slaked lime with or without tobacco. Until now, betel quid chewing is still one of the habit of people in several countries in Southeast Asia, including Indonesia. The culture of betel quid chewing is still high, especially in eastern Indonesia. The composition of quid used may vary in each area. Eastern Indonesia uses more Piper betel inflorescence (betel fruit) than betel leaf. A study on the cytotoxicity of a mixture of betel fruit, areca nut, and lime originating from NTT Kupang, has never been carried out. This study aimed to determine the cytotoxicity of the mixture extracts mentioned above against 3T3 cell lines fibroblast and its Inhibitory Concentration of 50% (IC50). Cytotoxicity test using MTT assay was carried out on fibroblast 3T3 cell lines on betel mixtures with concentrations of 0, 30, 60, and 120 µg/mL at the 24 and 48 hour incubation period. The extract mixture shows the highest toxic concentration of 120 µg/mL with an incubation period of 48 hours. The IC50 of the extract at the 24 and 48 hour incubation period was 125,21 µg/mL, and 155.06 µg/mL respectively. The mixture of Piper betel inflorescence, areca nut, and lime extracts is cytotoxic against 3T3 cell lines.

Keywords: cytotoxicity; piper betel inflorescence; areca nuts; slaked lime; 3T3

1. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kanker mulut adalah keganasan dalam rongga mulut yang meliputi area yang tercatat dalam ICD-10 C00-C08.(Cheong et al., 2017) Pada tahun 2020, 377.713 kasus baru kanker mulut dilaporkan dan angka kematian mencapai separuhnya (177.757 orang). (Globocan, 2020) Separuh dari jumlah kasus baru tersebut, berasal dari Asia, dan 11% berasal dari negara Asia Tenggara dimana Indonesia termasuk didalamnya.(Cheong et al., 2017) Data prevalensi kanker mulut di Indonesia hingga saat ini belum mengalami perbaharuan. Data terakhir tercatat pada Globocan 2012, ASR (*age-standard rate*) laki- laki yaitu 2,8/100.000 dan perempuan 1,9/100.000 orang. (Cheong et al., 2017) Perilaku yang mempengaruhi peningkatan risiko terjadinya kanker mulut adalah merokok, minum alkohol, dan mengunyah sirih pinang.(Hung et al., 2020) Data survey demografi kesehatan melaporkan bahwa penggunaan tembakau pada laki-laki di seluruh Asia Tenggara melebihi 50%. Indonesia dan Timur Leste merupakan 2 negara tertinggi yang penduduk laki- lakinya mengkonsumsi rokok terbanyak di dunia hingga lebih dari 70%.(Eriksen et al., 2015)(Sreeramareddy et al., 2014)

Hasil penelitian Amtha dkk melaporkan bahwa merokok merupakan faktor risiko kanker mulut pada populasi di Jakarta.(Amtha et al., 2014) Mengunyah sirih di kota Jakarta merupakan kebiasaan yang sudah berkurang. Hal ini berbeda jika dibandingkan dengan masyarakat pada Indonesia bagian Timur.(Amtha et al., 2014)(Kemenkes, 2018) Tahun 2003 WHO telah menyatakan bahwa kebiasaan menyirih dengan atau tanpa tembakau dapat memicu kanker mulut. Pinang digunakan dalam menyirih oleh sekitar 600 juta orang di seluruh dunia. Diperkirakan 10±20% penduduk dunia menyirih pinang dalam beberapa bentuk, sering dicampur dengan sirih.(P. C. Gupta & Warnakulasuriya, 2002) Hasil meta-analisis oleh Gupta dan Johnson melaporkan bahwa kebiasaan menyirih dengan atau tanpa tembakau meningkatkan insidensi kanker mulut di South Asia dan Pacific.(B. Gupta & Johnson, 2014)

Tembakau memperparah risiko kanker mulut, tetapi ternyata buah pinang sendiri telah ditemukan dapat memicu carcinogenesis. Pinang adalah zat psikoaktif keempat yang paling umum digunakan di dunia setelah kafein, alkohol, dan nikotin.(Cheong et al., 2017)(Richa, A et al.,2014). Kebiasaan menyirih telah terbukti menjadi penyebab setengah dari keseluruhan kasus kanker mulut terutama pada negara-negara yang mempunyai budaya menyirih pada masyarakatnya.(Zain et al., 2007) Mengunyah sirih masih menjadi kebiasaan di beberapa negara seperti India, Pakistan, Bangladesh, Sri Lanka, Maldives, RRC, dan Taiwan. Kebiasaan mengunyah sirih di negara-negara tersebut memiliki komponen yang berbeda-beda tergantung kebiasaan setempat. Beberapa daerah menggunakan buah pinang yang mentah sedangkan ada juga daerah menggunakan buah pinang yang sudah diproses.(P. C. Gupta & Warnakulasuriya, 2002)(International Agency for Research on Cancer, 2004) Di Indonesia kebiasaan mengunyah sirih masih sering ditemukan pada masyarakat di wilayah Timur dan sebagian besar dilakukan oleh perempuan (97%) diatas 35 tahun.(International Agency for Research on Cancer, 2004)(Kemenkes, 2018)

Riskesdas 2013 melaporkan bahwa komposisi menyirih di Indonesia terdiri dari daun sirih, buah pinang, dan kapur. Dapat juga ditambahkan rempah-rempah lain seperti gambir, tembakau, cengkeh dan lain-lain sebagai perasa tambahan.(Kemenkes, 2013) Sebagian besar wilayah di Indonesia tembakau tidak digunakan sebagai bahan utama menyirih, tetapi tembakau digunakan beberapa menit setelah menyirih yang dikenal dengan suntil dan sering diletakan pada area komisura labial untuk membersihkan gigi.(International Agency for Research on Cancer, 2004) Pada masyarakat yang mengunyah sirih banyak yang tidak menjaga kebersihan giginya dikarenakan mereka percaya bahwa mengunyah sirih dapat memperkuat gigi dan menghilangkan bau nafas. Hal ini dikarenakan adanya kandungan minyak atsiri pada daun sirih yang bersifat

bakterisid.(Taukora et al., 2016) Studi menunjukkan bahwa komponen utama minyak atsiri terdapat fenol dan flavonoid beserta derivatifnya (Sujono et al., 2019)(Harini et al., 2018). Selain itu, Taukora, 2016 melaporkan bahwa salah satu senyawa turunannya adalah kavikol yang memiliki daya bakterisida lima kali lebih kuat dibandingkan fenol.(Taukora et al., 2016) Namun asumsi masyarakat sering merasa bahwa dengan mengunyah sirih, maka sudah cukup dalam mencegah penyakit dalam mulut, sehingga sering tidak melakukan sikat gigi secara teratur serta tidak banyak yang mengetahui efek samping dari campuran bahan yang dipakai dalam menyirih. Kebiasaan mengunyah sirih merupakan salah satu faktor penyebab kanker mulut dikarenakan kandungan alkaloidnya berupa *arecoline*, *arecaidine*, *guavacine*, dan *guavacoline* pada buah pinang.(Cheong et al., 2017)(Richa, A et al.,2014) Mengunyah sirih dapat menggunakan beraneka bahan tergantung adat masing-masing wilayah.(P. C. Gupta & Warnakulasuriya, 2002)

Di Indonesia bagian Barat menggunakan daun sirih sedangkan di Indonesia bagian Timur lebih sering menggunakan buah sirih (*inflorescence*). Kebiasaan menyirih pada masyarakat di Indonesia bagian Barat biasanya disertai gambir dan kapur basah, sedangkan pada Indonesia bagian Timur digunakan buah pinang muda dan kapur kering. Hal ini mungkin dapat mempengaruhi perbedaan prevalensi kanker mulut yang terjadi. Namun hingga saat ini belum terdapat penelitian nasional yang dapat mengungkapkan alasan terjadinya perbedaan prevalensi yang terjadi. Perbedaan cara penggunaan dalam kebiasaan menyirih menyebabkan risiko terjadinya kanker mulut berbeda pada setiap individu.(Orlan et al., 2020). Adanya perbedaan komposisi menyirih pada beberapa daerah di Indonesia membutuhkan pembuktian laboratorium lebih lanjut, untuk dapat mengetahui apakah masing-masing komposisi tersebut bersifat toksik pada mukosa mulut atau jaringan epitel dengan melakukan uji sitotoksitas melalui MTT Assay. Uji sitotoksitas adalah uji suatu potensi bahan apakah bersifat toksik terhadap sel dengan menggunakan kultur sel, antara lain sel 3T3. Galur Sel 3T3 adalah sel fibroblast yang didapatkan dari kultur embrio mencit yang biasanya digunakan dalam penelitian *in vitro* karena kemampuannya menghasilkan *growth factor* yang menjadikannya indikator dalam test MTT Assay. Uji MTT Assay secara signifikan membantu para peneliti untuk menentukan apakah salah satu senyawa uji memiliki toksisitas sel atau aktivitas proliferasi.(Bahuguna et al., 2017)

Rumusan Masalah

Apakah campuran komposisi dari buah sirih, pinang dan kapur (Kupang, Indonesia Timur) bersifat sitotoksik terhadap galur sel 3T3?

2. METODE PENELITIAN

Penelitian uji laboratorik untuk melihat sitotoksitas campuran ekstrak buah sirih, pinang dan kapur terhadap galur sel 3T3 dengan menggunakan MTT Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Buah sirih, pinang, dan kapur didapatkan dari NTT, Kupang. Pembuatan ekstrak campuran ketiga bahan alam diawali dengan mengeringkan buah sirih dan buah pinang dalam oven 70°C selama 3 hari. Campuran (buah sirih 75 gr, pinang 50 gr, kapur 1 gr) kemudian dihaluskan dengan blender dengan air 600 ml. Campuran disaring menghasilkan larutan tanpa padatan. Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring 0.22 µm dan hasilnya disebut sebagai ekstrak. Encerkan ekstrak tersebut sehingga tercapai jumlah yang diinginkan (1200 µg/mL). MTT Assay dilakukan pada berbagai konsentrasi ekstrak (0, 30, 60, 120 µg/mL). Dimulai dengan melakukan *plating* sel T3T 5 x 10³ pada medium DMEM 89%(10% FBS, 1 % Penicilin + Streptomycin + Alfroticin), dan diinkubasi pada CO₂ dengan suhu 37°. Setelah sel mencapai konfluensi 80%, selanjutnya sel disubkultur untuk MTT pada 96 well selama 24 dan 48 jam. 10%

MTT dengan konsentrasi 5mg/ml di larutkan dalam PBS 100 µl. Setelah 24 jam, ekstrak berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam well dan ditambahkan reagen MTT, selanjutnya diinkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi dilakukan penambahan HCl 0,1M sebanyak 100µl untuk menghentikan reaksi. Pencucian dan pembacaan hasil menggunakan spektrofotometri 570 nm. Semua perlakuan dilakukan *triplo*. Data analisis disajikan secara deskriptif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

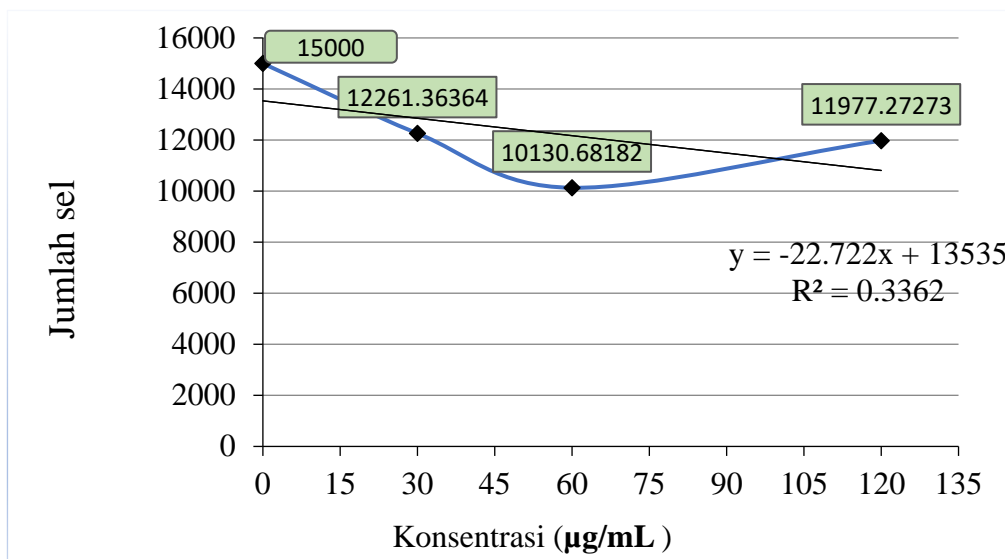
Standar penentuan hasil pengukuran MTT Assay menggunakan basal medium untuk mengetahui jumlah sel/well yang akan digunakan untuk perlakuan pada tahap selanjutnya tercantum pada Tabel 1. Sedangkan hasil MTT Assay setelah diberikan perlakuan campuran ekstrak buah sirih, pinang, dan kapur dalam berbagai konsentrasi pada masa inkubasi 24 dan 48 jam terhadap galur sel 3T3 tampak pada Tabel 2. Gambaran peningkatan atau penurunan sel yang hidup setelah diberikan perlakuan ekstrak campuran buah sirih, pinang, dan kapur digambarkan dalam grafik yang merujuk pada persamaan garis linear $y=ax+b$ (y = jumlah sel, x = konsentrasi ekstrak). Persamaan R^2 adalah tingkat validitas data dengan semakin tinggi angkanya ($>0,9$) maka hasil yang diperoleh semakin valid.

Tabel 1. Standar penentuan hasil pengukuran MTT Assay yang dihubungkan dengan jumlah sel/well dalam masa inkubasi 24 dan 48 jam

	Basal Medium basal medium dan sel 3T3 dengan berbagai pengenceran	
	24 jam	48 jam
Basal Medium	0,058 ± 0,001	0,059 ± 0,003
5000 sel/well	0,155 ± 0,053	0,202 ± 0,014
500 sel/well	0,129 ± 0,009	0,166 ± 0,005
50 sel/well	0,101 ± 0,011	0,141 ± 0,013

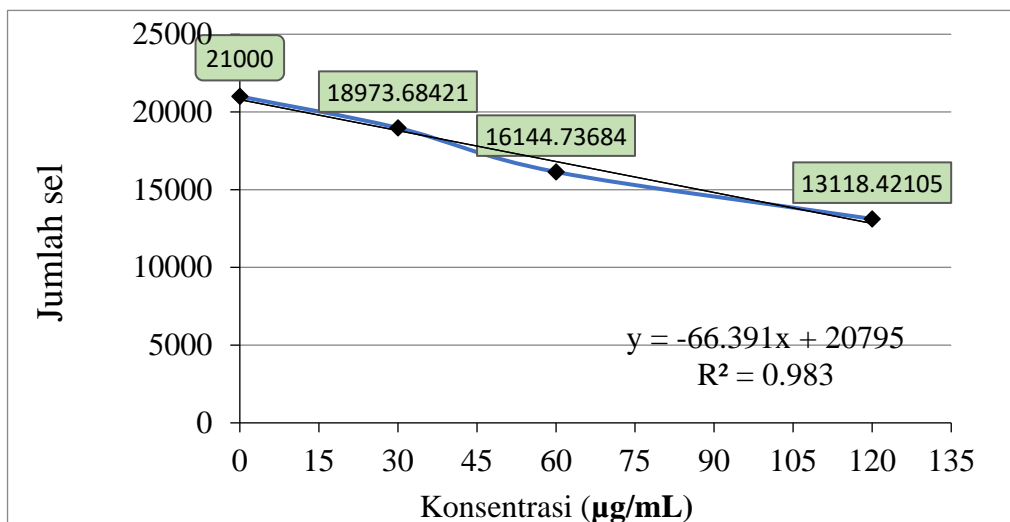
Tabel 2. Hasil MTT Assay setelah diberikan perlakuan campuran ekstrak buah sirih, pinang, dan kapur dalam masa inkubasi 24 & 48 jam terhadap galur sel 3T3 pada konsentrasi yang berbeda

Konsentrasi (µg/mL)	Masa Inkubasi	
	24 jam	48 jam
0	0,095 ± 0,008	0,115 ± 0,003
30	0,155 ± 0,005	0,204 ± 0,036
60	0,144 ± 0,013	0,197 ± 0,018
120	0,154 ± 0,009	0,189 ± 0,013



Gambar 1. Hasil sitotoksitas ekstrak terhadap jumlah sel 3T3 dalam periode 24 jam

Gambar 1 menunjukkan penurunan jumlah sel yang hidup secara tidak linear pada ekstrak campuran buah sirih, pinang, dan kapur dengan konsentrasi 0, 30, 60, dan 120 µg/mL yang diberikan pada sel dalam masa inkubasi 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, akan tetapi pada konsentrasi lebih tinggi (120 µg/mL) sel yang hidup bertambah banyak.



Gambar 2. Hasil sitotoksitas ekstrak terhadap jumlah sel 3T3 dalam periode 48 jam

Gambar 2. menunjukkan penurunan jumlah sel yang hidup secara linear pada campuran sirih dengan berbagai konsentrasi dalam masa inkubasi 48 jam. Semakin tinggi konsentrasi maka jumlah sel yang hidup akan semakin rendah.

Tabel 3. Hasil IC50 pada ekstrak campuran dalam masa inkubasi 24 dan 48 jam

	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	24 jam	48 jam
Ekstrak	125,21	155,06

Tabel 3. menunjukkan IC50 pada setiap perlakuan dengan masa inkubasi 24 dan 48 jam. Pada ekstrak campuran dengan masa inkubasi 24 jam IC50 adalah 125,21 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC50 pada masa inkubasi 48 jam meningkat menjadi 155,06 $\mu\text{g/mL}$. Grafik menggambarkan peningkatan IC50 dengan masa inkubasi yang lebih lama (48 jam).

Kebiasaan menyirih diketahui memiliki efek karsinogenik karena dapat memicu kanker mulut dan esofagus.(Secretan et al., 2009) Hal ini sering dikaitkan dengan kandungan alkaloid dari campuran sirih yang terdiri dari pinang dan zat kimia dalam kapur.(Taukooah et al., 2016) Telah diketahui bahwa di Indonesia bagian Timur lebih banyak menggunakan *inflorescence* sirih (buah sirih) daripada daun sirih.(Orlan et al., 2020) Perbedaan buah sirih dan daunnya adalah pada kandungan safrol yang tinggi. Menyirih dengan buah sirih dapat membentuk safrol yang tinggi (68 $\mu\text{g/mL}$) pada saliva yang akan menginduksi oksidatif stress. (Yu et al., 2011) Pada penelitian sebelumnya ditemukan bahwa safrol bersifat sitotoksik terhadap sel mencit. Zat ini akan dimetabolisme oleh sitokrom hati P450 dan akan menjadi zat intermediate 1-hydroxysafrole, selanjutnya komponen ini akan mengalami reaksi sulfur dan menjadi *sulfuric acid ester* yang tidak stabil yang dapat memicu kanker hati. Semakin tinggi konsentrasi safrol yang diberikan, maka oksidatif stress yang dihasilkan semakin meningkat. Pada sel manusia, safrol diduga dapat mengikat DNA dan menurunkan level populasi sel CD3 (T cell) dan CD19 (B cell) (Yu et al., 2011).

Tetapi belum ada penelitian yang jelas mengenai safrol terhadap kanker pada manusia. Kandungan alkaloid dari buah pinang bersifat sitotoksik dan genotoksik serta menghambat pertumbuhan kultur sel termasuk sel epitel mulut.(International Agency for Research on Cancer, 2004) Selain itu pada penelitian sebelumnya, *arecoline* yang merupakan alkaloid utama pada buah pinang dapat menghambat siklus sel, memicu apoptosis, menghambat sintesis fibroblas gingiva, dan bersifat sitotoksik terhadap sel endotel.(International Agency for Research on Cancer, 2004) Penelitian lain membuktikan bahwa *arecoline* menghambat pertumbuhan dan sintesis protein sel kultur fibroblas periodontal dan sel epitel mulut. Kadar *arecoline* pada saliva selama mengunyah sirih mencapai 76,93 ng/mL, sedangkan kadar sesudah mengunyah sirih pinang mencapai kadar 196,18 ng/mL *arecoline*. Kadar ini dapat menstimulasi sintesis kolagen dan menurunkan proliferasi fibroblas, selain itu dapat menyebabkan sitotoksitas pada keratinosit (Deepak, V et al., 2018) *Arecoline* menurunkan kadar Thiols intraseluler.

Thiols memiliki peran penting dalam fungsi sel, untuk mempertahankan integritas membran, mengoptimalkan transport asam amino dan aktivitas enzim sel, meregulasi aktivitas proliferasi sel, dan memberikan perlindungan sel terhadap zat asing.(Liu et al ., 2016) Proliferasi sel sangat penting dalam menjaga jaringan periodontal dan respon optimal terhadap penyembuhan luka. *Arecoline* menghambat proses reparatif dan regeneratif jaringan periodontal, sehingga *arecoline* bersifat sitotoksik terhadap sel periodontal.(Chiang et al., 2007) *Arecoline* menghambat ekspresi dan transaktivasi dari fungsi p53. Hal ini menyebabkan supresi dari reparasi DNA. *Arecoline* juga mempengaruhi sel pada saat prometafase pada tahap G2-M dengan membuat banyak kesalahan pada kromosom dengan cara mempengaruhi benang spindel

pada tahap mitosis, sehingga membuat urutan benang spindel terdistorsi dan berakhir pada terhambatnya siklus sel.(Tseng et al., 2012) Kapur yang merupakan salah satu komponen dalam menyirih, akan meningkatkan pH dalam rongga mulut hingga 10 dan mengganggu siklus sel, metabolisme, apoptosis, dan memicu keganasan.(P. C. Gupta & Warnakulasuriya, 2002)(Capuano P et al., 2003) Sedangkan sel epitel normal dapat bertahan pada pH 6,8-7,4. Selain itu kapur akan menghasilkan sejenis oksigen reaktif (*hidrogen peroxide*) secara *in vitro*, dan menghasilkan radikal bebas yang akan menyerang DNA, sehingga terdapat perubahan kromosom pada sel.(P. C. Gupta & Warnakulasuriya, 2002)(International Agency for Research on Cancer, 2004) Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Vinneegas, safrol bersifat sitotoksik terhadap galur sel fibroblas manusia dengan $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.(Madrid Villegas et al., 2011).

Pada penelitian ini didapatkan IC_{50} pada masa inkubasi 24 dan 48 jam memiliki IC_{50} 125,21 $\mu\text{g/mL}$ dan 155,06 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan ekstrak campuran dan kapur pada penelitian ini mempunyai sitotoksitas yang tinggi sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya. Perbedaan sitotoksitas dapat dipengaruhi antara lain karena adanya perbedaan galur sel, jenis sirih dan pinang, serta konsentrasi dari ekstrak yang digunakan. Penurunan sel 3T3 pada masa inkubasi 24 jam setelah diberikan ekstrak tidak menunjukkan penurunan secara linear berdasarkan peningkatan konsentrasinya, hal ini kemungkinan disebabkan karena beberapa kondisi yaitu kandungan ekstrak terdiri dari komponen yang tidak bisa seluruhnya homogen (antara ekstrak buah sirih, pinang dan kapur), masa inkubasi yang cenderung masih singkat, jumlah sel dalam tiap *well* kurang terstandarisasi dan dapat juga dipengaruhi oleh human (*pipetting error*) serta kemampuan ekstrak yang belum potensial untuk mematikan nukleus sel dalam medium sehingga sel masih mampu berproliferasi. Jika dibandingkan antara masa inkubasi 24 dan 48 jam, tampak penurunan jumlah sel 3T3 terjadi secara linear seiring dengan bertambahnya periode inkubasi dan konsentrasi. Hal ini mengindikasikan bahwa pada penggunaan sirih, pinang serta kapur dalam masa yang singkat, belum cukup untuk menyebabkan kelainan dalam mukosa mulut secara langsung. Hal ini mendukung teori yang menyatakan bahwa kanker mulut merupakan penyakit yang bersifat kronis, berjalan lambat, dengan mengubah signal sel secara perlahan dan bersifat akumulatif sehingga pada periode waktu tertentu akhirnya menimbulkan manifestasi yang dapat dilihat secara klinis.(Ram et al., 2011)

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Campuran ekstrak buah sirih, pinang, dan kapur bersifat paling sitotoksik terhadap sel 3T3 pada konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$ dalam masa inkubasi 24 jam, sedangkan pada masa inkubasi 48 jam konsentrasi yang paling toksik adalah 120 $\mu\text{g/mL}$. IC_{50} pada masa inkubasi 24 dan 48 jam memiliki IC_{50} 125,21 $\mu\text{g/mL}$ dan 155,06 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian lebih lanjut perlu dilakukan uji fitokimia terhadap masing- masing bahan alam buah sirih, pinang dan kapur yang berasal dari NTT Kupang yang dipakai pada penelitian, untuk dapat diketahui efek sitotoksitas dari bahan kimia yang sering digunakan untuk campuran mengunyah sirih ini. Selain itu sitotoksitas ekstrak campuran pada berbagai galur sel perlu dilakukan untuk dapat diketahui konsistensi sifat toksisitasnya terhadap sel mukosa mulut.

REFERENSI

- Amtha, R., Razak, I. A., Basuki, B., Roeslan, B. O., Gautama, W., Puwanto, D. J., ... Zain, R. B. (2014). Tobacco (Kretek) Smoking, Betel Quid Chewing and Risk of Oral Cancer in a Selected Jakarta Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), 8673–8678. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.20.8673>
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 8. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>
- Capuano, P., & Capasso, G. (2003). The importance of intracellular pH in the regulation of cell function. *G Ital Nefrol*, 20(2), 139–150
- Cheong, S. C., Vatanasapt, P., Yi-Hsin, Y., Zain, R. B., Kerr, A. R., & Johnson, N. W. (2017). Oral cancer in South East Asia: Current status and future directions. *Translational Research in Oral Oncology*, 2, 2057178X1770292. <https://doi.org/10.1177/2057178X17702921>
- Chiang, S.-L., Jiang, S.-S., Wang, Y.-J., Chiang, H.-C., Chen, P.-H., Tu, H.-P., ... Ko, Y.-C. (2007). Characterization of Arecoline-Induced Effects on Cytotoxicity in Normal Human Gingival Fibroblasts by Global Gene Expression Profiling. *Toxicological Sciences*, 100(1), 66–74. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm201>
- Deepak, V., R S Puranik, S S Vanaki, & Surekha R, P. (2018). Study of salivary arecoline in areca nut chewers. *J Oral Maxillofac Pathol*, 22(3), 446–446.
- Eriksen, M. P., Mackay, J., Schluger, N. W., Islami, F., & Drope, J. (2015). *The tobacco atlas*. Atlanta, Georgia, 30303, USA: Published by the American Cancer Society.
- Gupta, B., & Johnson, N. W. (2014). Systematic Review and Meta-Analysis of Association of Smokeless Tobacco and of Betel Quid without Tobacco with Incidence of Oral Cancer in South Asia and the Pacific. *PLoS ONE*, 9(11), e113385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113385>
- Gupta, P. C., & Warnakulasuriya, S. (2002). Global epidemiology of areca nut usage. *Addiction Biology*, 7(1), 77–83. <https://doi.org/10.1080/13556210020091437>
- Harini, S. S., Sougandhi, P. R., Tenkayala, D. S. R., & Gopinath, K. R. (2018). ANTIOXIDANT ACTIVITY (PHENOL AND FLAVONOID CONTENT) OF THREE DIFFERENT CULTIVARS OF PIPER BETLE L. (PIPERACEAE). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5-s), 143–148. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1978>
- Hung, L.-C., Kung, P.-T., Lung, C.-H., Tsai, M.-H., Liu, S.-A., Chiu, L.-T., ... Tsai, W.-C. (2020). Assessment of the Risk of Oral Cancer Incidence in A High-Risk Population and Establishment of A Predictive Model for Oral Cancer Incidence Using A Population-Based Cohort in Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 665. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020665>
- International Agency for Research on Cancer. (2004). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 85, Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines: This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 11 - 18 June 2003*. Lyon: IARC.
- International Agency for Research on Cancer, & WHO. (n.d.). Lip, Oral Cavity. *Globocan 2020*.
- Kemenkes, R. I. (2013). *Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas)*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kemenkes, R. I. (2018). *Hasil Utama Reset Kesehatan Dasar (RISKESDAS)*. Kementerian Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

- Liu, Y.-J., Peng, W., Hu, M.-B., Xu, M., & Wu, C.-J. (2016). The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: A review. *Pharmaceutical Biology*, *54*(11), 2753–2760. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1160251>
- Madrid Villegas, A., Espinoza Catalán, L., Montenegro Venegas, I., Villena García, J., & Carrasco Altamirano, H. (2011). New Catechol Derivatives of Safrole and Their Antiproliferative Activity towards Breast Cancer Cells. *Molecules*, *16*(6), 4632–4641. <https://doi.org/10.3390/molecules16064632>
- Orlan, E., Duncan, K., Amtha, R., & Parascandola, M. (2020). Characteristics of Current Betel Quid/Chewing Tobacco Users, Smokers and Dual Users in Indonesia: An Analysis of GATS 2011 Data. *Substance Use & Misuse*, *55*(9), 1509–1512. <https://doi.org/10.1080/10826084.2020.1762649>
- Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M. L. B., & Mohammad, S. (2011). Oral Cancer: Risk Factors and Molecular Pathogenesis. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, *10*(2), 132–137. <https://doi.org/10.1007/s12663-011-0195-z>
- Richa, A., Chandan, D., Sumanth, P., & Ipseeta, M. (2014). Betel nut chewing and its deleterious effects on oral cavity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics, Volume 10*(Issue 3).
- Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... Cogliano, V. (2009). A review of human carcinogens—Part E: Tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology*, *10*(11), 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70326-2)
- Sreeramareddy, C. T., Pradhan, P. M. S., Mir, I. A., & Sin, S. (2014). Smoking and smokeless tobacco use in nine South and Southeast Asian countries: Prevalence estimates and social determinants from Demographic and Health Surveys. *Population Health Metrics*, *12*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12963-014-0022-0>
- Sujono, H., Rizal, S., Purbaya, S., & Jasmansyah, J. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Minyak atsiri Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kartika Kimia*, *2*(1), 5. <https://doi.org/10.26874/jkk.v2i1.27>
- Taukoorah, U., Lall, N., & Mahomoodally, F. (2016). Piper betle L. (betel quid) shows bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics. *South African Journal of Botany*, *105*, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.01.006>
- Tseng, S.-K., Chang, M.-C., Su, C.-Y., Chi, L.-Y., Chang, J. Z.-C., Tseng, W.-Y., ... Jeng, J.-H. (2012a). Arecoline induced cell cycle arrest, apoptosis, and cytotoxicity to human endothelial cells. *Clinical Oral Investigations*, *16*(4), 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0604-1>
- Yu, F.-S., Yang, J.-S., Yu, C.-S., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Lin, C.-W., & Chung, J.-G. (2011). Safrole Induces Apoptosis in Human Oral Cancer HSC-3 Cells. *Journal of Dental Research*, *90*(2), 168–174. <https://doi.org/10.1177/0022034510384619>
- Zain, R. Bte., Ikeda, N., Gupta, P. C., Warnakulasuriya, S., Wyk, C. W., Shrestha, P., & Axéll, T. (2007). Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits: Consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-27, 1996. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *28*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1999.tb01985.x>

