

**UJI AKTIFITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL
KULIT BATANG *Bruguiera gymnorhiza* TERHADAP SEL MEYLOMA**

Warsinah¹, Puji Lestari², Trisnowati³

^{1,3}Program Studi Farmasi, FKIK Unsoed Purwokerto

²Program Studi Kimia, Jurusan MIPA Unsoed Purwokerto

ABSTRACT

Mangrove vegetation especially tancang (*Bruguiera gymnorhiza*) known as a kind of plant that used as an ingredients for traditional medicine. Bioactive compound in tancang bark has potential medical. Although there is no previous experiment about tancang bark, few compounds from *Bruguiera* genus has been experimented and has an activity as an anti-cancer and anti-tumor. The purpose of this experiment is to conduct sitotoxicity tancang bark against Meyloma cell. Tancang bark sample that used obtained from Tritih beach at Cilacap. Tancang bark that has been cleaned and dried is cut and then crused until it obtain powder. The powder is been maceration with 96% ethanol and been evaporation. The extract that obtain is used in sitotoxicity test using MTT (3-(4,5-dimethylthiazoil-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide) method toward Meyloma cell after 24 hour of incubation using several concentration variation. Tancang bark extract in ethanol has LC₅₀ value 508.19 µg/ml. Morphology analyze and nuclear staining shows that there is apoptosis activity even in small amount. The result shows that tancang bark extract has a potency as an anti-cancer toward Meyloma cell. .

Keywords : Bruguiera gymnorhiza, antiproliferatif, meyloma

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler. Sel kanker mempunyai ciri khusus pada fenotipnya, yang disebabkan karena adanya mutasi pada genotifnya, yaitu mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri, tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferatif, mampu menginduksi angiogenesis serta mampu menginvasi jaringan di sekitarnya dan membentuk metastasis (Hanahan and Winberg, 2000)

Terapi pengobatan kanker yang utama seperti pembedahan dan radiasi hanya dapat dilakukan pada kanker lokal stadium awal. Pengobatan ini gagal digunakan untuk kanker yang telah berkembang pada stadium lanjut dan mengalami metastasis. Sementara pengobatan kanker dengan obat-obatan khemoterapi hanya efektif untuk

beberapa periode waktu saja. Oleh karena itu, pilihan pengobatan baru yang aman, efektif dan selektif pada penyakit kanker sangat penting.

Salah satu strategi untuk pengembangan obat kanker adalah dengan menemukan senyawa-senyawa yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen pengatur pertumbuhan atau proliferasi sel (Gibbs,2000). Dean (1998), mengatakan Cell cycle progresion merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferasi sel. Proses ini diatur oleh regulator positif (onkogen) dan regulator negatif (minor supresor gen).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa bahan-bahan dari tanaman ternyata memiliki potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen tumor supresor, sehingga berpotensi sebagai antikanker (Cardenas, *et.al*, 1998). *B. gymnorhiza* (Bakau) merupakan salah tanaman yang

mempunyai potensi antitumor. Daun tanaman ini mengandung saponin, alkaloid, flavanoid, senyawa polifenol, kulit batang mengandung senyawa alkaloid dan polifenol yang hingga kini masih diteliti aktifitasnya sebagai antikanker.

Berdasarkan kenyataan empiris tersebut, maka tidak menutup kemungkinan tanaman *B. gymnorrhiza* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorrhiza* terhadap sel Meiloma.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah sel Meiloma diperoleh dari koleksi laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada, bahan tanaman berupa kulit batang diperoleh tanaman yang tumbuh di pantai Nusakambangan Cilacap, tanaman tersebut selanjutnya diidentifikasi di bagian Taksonomi Fakultas Biologi Unsoed sebagai *B. Gymnorrhiza*

Preparasi Ekstrak

Kulit batang tanaman *Bruguiera gymnorrhiza* L yang telah dikumpulkan dicuci dengan air, dikeringkan, ditumbuk dan diayak dengan ayakan B₄₀. serbuk diekstraksi dengan pelarut etanol 90% dalam labu Soxhlet. Ekstrak dipekatkan dengan evaporator.

Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT (Da'i, 2003)

Masing-masing seri kadar ekstrak yang telah dibuat didistribusikan ke dalam sumuran dari *well plate*. Enam buah seri kadar dimasukkan ke dalam satu kolom sumuran. Seri kadar menggunakan tiga buah replikasi. Kemudian sel Hela dengan kerapatan 3×10^4 didistribusikan bersama-sama ke dalam seri kadar, blanko, dan media

kultur ke dalam sumuran sampai volumenya 200 μ L, selanjutnya diinkubasi di dalam inkubator menggunakan suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5% konstan selama 24 jam. Akhir inkubasi, masing-masing sumuran diambil sebanyak 170 μ L dan ditambah dengan media kultur sebanyak 100 μ L. Kontrol media menggunakan 100 μ L media kultur. Tiap sumuran ditambahkan 15 μ L MTT 5 mg/mL dalam medium RPMI. Setelah penambahan MTT, *plate* ditutup rapat dan dimasukkan dalam inkubator selama 4 jam. Selanjutnya reaksi di dalam *plate* dihentikan dengan menggunakan larutan SDS 10% (reagen stoper) dan dibiarkan dalam suhu kamar (27°C) selama 24 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Serapan dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Pengecatan DNA

Pada akhir inkubasi (jam ke 24,48 dan 72), medium diambil, sel difiksasi dengan metanol pada obyek glass kemudian ditambahkan RNA-ase dan Etidium Bromida 0,1%, kemudian ditutup dengan deck glass. Sel diamati setelah 30 menit di bawah mikroskop fluoresensi. Sel dianalisis secara kualitatif dengan mengamati adanya perubahan morfologi.

Analisis Data

Potensi aktifitas sitotoksik ditentukan dengan pengamatan perubahan morfologis melalui analisis kualitatif dan nilai LC₅₀ melalui analisis probit. Angka probit merupakan konversi % sel hidup.

$$\% \text{ sel hidup} = (A-B)/Ax100\%$$

A= jumlah sel hidup pada kontrol

B= Jumlah sel hidup pada perlakuan sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksitas

Uji toksitas dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorrhiza* benar-benar bersifat

toksik terhadap sel meiloma . uji sitotoksitas dengan Pengamatan intensitas warna menggunakan *ELISA reader* menghasilkan harga serapan yang berbeda-beda untuk setiap perlakuan. Harga serapan dari setiap sumuran berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup. Persentase kematian sel Meiloma berdasarkan harga absorbansi (tabel 1) dari uji sitotoksitas dapat diperoleh dosis yang menyebabkan

kematian sel sebesar 50% dari populasi sel atau LC_{50} . hal ini perlu karena dosis yang relatif tidak mematikan dan untuk memastikan bahwa apabila terjadi kematian sel adalah benar-benar karena ekstrak bersifat toksik terhadap sel, bukan karena dosis yang terlalu besar yang dapat mengganggu keseimbangan media. Hasil perhitungan menunjukkan adanya korelasi antara sel yang mati dengan kenaikan kadar sampel.

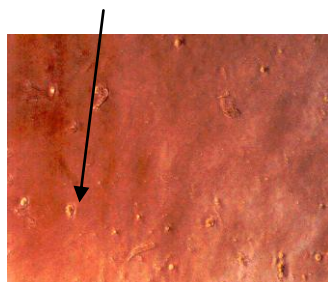
Tabel 1. Persentase kematian sel Meiloma akibat penambahan sampel

	Kadar	Rata-rata Absorbansi	Kontrol Sel	Kontrol Media	Log kadar	% Kematian	Probit
B	1000	0,361	0,795	0,196	3	72,06	5,5
C	800	0,4555	0,822	0,186	2,9	59,9	4,98
D	600	0,491	0,684	0,197	2,77	51,57	5,15
E	100	0,5615	1,038	0,205	2	42,01	4,7
F	50	0,7155	0,941	0,206	1,7	22,93	4,26
G	25	0,821	0,931	0,218	1,4	7,11	3,52

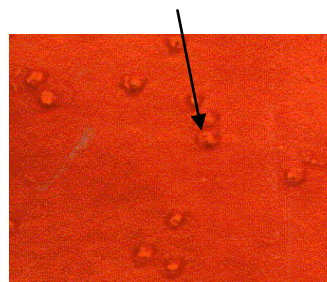
Pada Tabel 1 memperlihatkan bahwa pada kadar ekstrak etanol kulit batang *B gymnorhiza* 1000 $\mu\text{g/mL}$ persentase kematian sel Meiloma mencapai 76,06% dan cenderung menurun bila kadar ekstrak etanol yang diinkubasikan bersama sel Meiloma menurun. Hal ini berarti potensi ketoksikan ekstrak etanol kulit batang *B gymnorhiza* tergantung dosis (*dose dependent*). Persentase kematian sel yang diinkubasikan dengan DMSO relatif rendah yaitu dibawah 10%, berarti DMSO yang digunakan sebagai pelarut ekstrak relative tidak toksik terhadap sel Meiloma dan memungkinkan penggunaan DMSO sebagai pelarut

senyawa uji. Selain kematian sel sebagai implementasi ketoksikan ekstrak etanol kulit batang *B gymnorhiza*, juga dapat dilihat dari morfologi sel Meiloma. Pengamatan mikroskopik menunjukkan adanya perbedaan morfologi pada sel kontrol dan perlakuan (Gambar 1). Sel kontrol tampak berbentuk seperti daun, menempel di dasar sumuran, sedangkan sel dengan perlakuan kadar 1000 $\mu\text{g/ml}$ tampak banyak yang mati dan berubah bentuknya, keruh dan mengapung. Pengamatan morfologi menunjukkan karakteristik sel Meiloma, pada sampel sel Meiloma mati dan tidak terbentuk serabut formazan.

Sel Meiloma Kontrol (A)



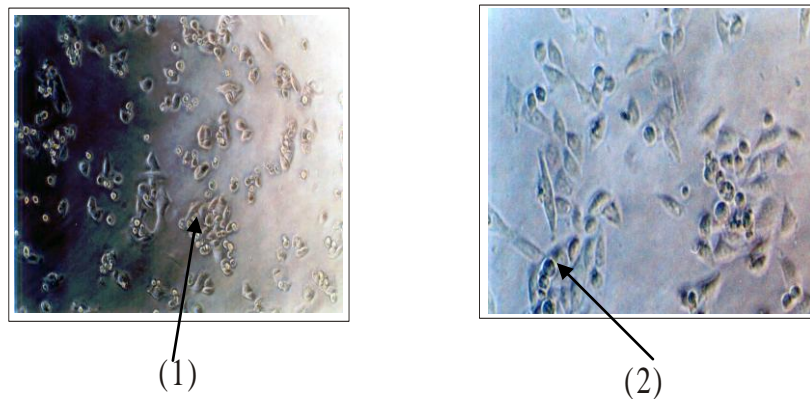
Sel meiloma dengan pelarut DMSO (B)



Gambar 1. Morfologi Sel Meiloma dalam sumuran, perbesaran 150x.

Sel kontrol (A) sel hidup berbentuk seperti daun, menempel pada dasar sumuran, sel dengan pelarut DMSO (B), sel mati berbentuk bulat, keruh dan mengapung dalam media. Selanjutnya Pereaksi MTT ditambahkan ke dalam sumuran dan dilakukan pengamatan visual maupun morfologinya secara mikroskopik. Hasil pengamatan visual menunjukkan terjadi perubahan warna

pada sumuran perlakuan sampel berubah warnanya dari merah muda menjadi kuning muda, dan perlakuan kontrol pelarut DMSO dan kontrol sel berubah warnanya dari merah muda menjadi ungu dan terdapat serabut formazan berwarna ungu berbentuk jarum. Pengamatan morfologi setelah penambahan MTT dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi sel Meiloma dengan Penambahan MTT

- (1) Sel Meiloma yang hidup berwarna ungu dan dikelilingi oleh serabut formazan
- (2) Sel Meiloma yang mati berwarna gelap berbentuk bulat tanpa dikelilingi serabut formazan.

Data uji sitotoksik selanjutnya digunakan untuk perhitungan LC_{50} dengan metode analisis probit. Hasilnya memperlihatkan harga LC_{50} untuk ekstrak etanol kulit batang sebesar 508,19 $\mu\text{g/mL}$. Harga tersebut diperoleh dari persamaan linier antara harga log kadar dihubungkan dengan harga probit dengan persamaan linier $y = 2,31 + 1,08x$.

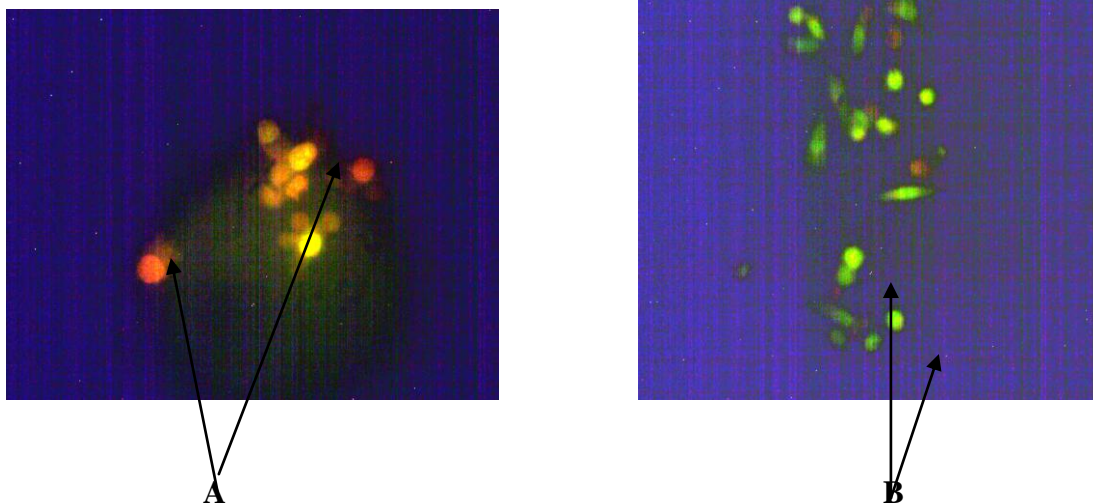
Pengecatan DNA

Pengecatan DNA dilakukan untuk memperoleh data kualitatif morfologi sel dengan menggunakan etidium bromida berdasarkan sifat etidium bromida yang dapat berinteraksi dengan DNA maupun RNA. Hasil pengecatan ini dapat diamati di bawah mikroskop Fluoresensi.

Hasil pengecatan DNA ditampilkan pada gambar 4. Perlakuan kadar 200 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak kulit batang terlihat

adanya DNA yang masih utuh, tampak terang sebagai spot jingga terang berbentuk bulat, dan ada yang telah terfragmentasi atau tidak utuh lagi. Hal ini berarti ada sel yang masih hidup dan ada juga yang mati. Adanya DNA yang terfragmentasi menunjukkan kematian sel adalah dengan mekanisme apoptosis.

Pada kontrol sel Meiloma tidak terjadi apoptosis, karena pada sel Meiloma, regulator apoptosis yaitu p53 diikat dan didegradasi oleh protein E6 dari HPV (Desaintes. *et al.*, 1999). Pada kadar ekstrak 200 $\mu\text{g/mL}$ mengindikasikan terjadinya mekanisme *cell cycle arrest* dan diduga ada kematian sel. Data pengecatan DNA mendukung dugaan adanya kematian sel dengan kemungkinan melalui mekanisme apoptosis.



Gambar 4. Penampakan morfologi DNA sel Meiloma setelah pengecatan dengan Etidium bromide pada jam 48 dengan perbesaran 100x.

Pengecatan DNA sel Meiloma dengan etidium bromida dilakukan dengan memfiksasi sel menggunakan metanol kemudian dicat. Sampel, sel dengan ekstrak etanol kulit batang *B gymnorrhiza* (A) dan kontrol sel diinkubasikan dengan media saja (B). Pada kontrol tampak adanya spot hijau terang yang menunjukkan DNA yang utuh sedangkan perlakuan ekstrak tampak adanya DNA yang utuh namun ada juga yang terfragmentasi yang mengindikasikan terjadinya apoptosis (tanda panah pada gambar A).

Senyawa alam yang terdeteksi di dalam senyawa uji yaitu alkaloid, terpenoid, senyawa fenol, secara sinergis atau individual mampu diduga mampu menghambat *cell cycle progression* dari sel Hela. Hal ini didukung oleh banyak data tentang aktivitas antitumor dari senyawa-senyawa alam tersebut.

Flavanoid yang tersebar luas dalam tanaman (Harborne,1987) telah disintesis bermacam-macam turunannya dan dievaluasi aktivitas antitumornya secara invitro terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7. *2'hidroxychalcones* dan *methoxylated flavonones* menunjukkan aktivitas antiproliferatif yang paling poten terhadap sel kanker payudara MCF-7. Terpenoid tertentu mampu

menghambat karsinogenesis. Kebanyakan diterpen dilakton aktif pada *human non-small cell lung tumor* (A-549) dan sel kanker kolon pada kultur sel.

Ada beberapa kemungkinan titik tangkap molekuler senyawa alam yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang *B gymnorrhiza*, sehingga berefek sebagai anti kanker. Kemungkinan pertama, senyawa alam tersebut mampu menghambat signal transduksi. Signal transduksi dimulai dengan adanya rangsangan dari luar sel yang berupa faktor pertumbuhan yang ditangkap oleh reseptor. Reseptor akan menyampaikan signal proliferaatif ke protein di sitoplasma. Aktivasi signal transduksi ini melalui proses fosforilasi dengan melibatkan ATP dan protein yang terlibat umumnya adalah jenis protein kinase (Gibbs,2000). Proses *signal transduction cassades* ini dapat dihambat oleh beberapa senyawa alam yang termasuk inhibitor fosfatase dan inhibitor kinase (Cardenas et al, 1998). Senyawa uji mungkin mengandung zat inhibitor kinase sehingga dapat menghambat *signal transduction cassades*. Misalnya adanya senyawa alkaloid dan terpenoid yang dapat berkompetisi dengan ATP dalam fosforilasi sehingga proses fosforilasi terhambat.

Kemungkinan kedua, mempengaruhi program *cell cycle* yaitu menghambat *cell cycle progression* dan menginduksi *cell cycle arrest*. Rangkaian signal transduksi berakhir di nukleus dan sel dari Go masuk ke G_1 phase. Signal transduksi menginisiasi faktor transkripsi yang akan mentranskripsi gen-gen yang dibutuhkan untuk jalanya *cell cycle*. Gen-gen tersebut antara lain *cyclins* dan *cyclins dependent kinase* (cdk). Untuk memfasilitasi G_1 progression, kedua protein D-type *cyclins* dan cdk 4 atau 6 harus membentuk kompleks untuk memfosforilasi pRb sehingga memacu *cell cycle progression*. Senyawa uji mungkin dapat menghambat fosforilasi pRb atau menginduksi *INK4 family proteins* yang merupakan protein penghambat CDK. Hambatan *cell cycle progression* ini juga dapat terjadi pada tiap : S phase, G_2/M transition yang biasanya berupa *cell cycle arrest* (Shapiro and Harper, 1999).

Kemungkinan ketiga, aktivitas protein p53 dan pRb dijaga. Pada sel hela protein p53 dan pRb dalam keadaan normal atau tidak termutasi, hanya diikat kemudian didegradasi oleh protein E₆ dan E₇ dari HPV (Desaintes *et al*, 2001). Senyawa uji kemungkinan mengandung zat yang dapat mencegah terjadinya degradasi p53 sehingga terjadi apoptosis.

Kemungkinan keempat, terjadinya penghambatan enzim telomerase. Telomer merupakan penutup ujung kromosom yang terdiri dari puluhan ribu pasangan basa yang merupakan sekuen berulang. Enzim telomerase bekerja dengan terus memperpanjang telomer sehingga sel bersifat imortal dan aktifitasnya tidak ditemukan dalam sel normal somatik (Sasaki, 2001). Protein E₆ dan E₇ dari HPV yang menginfeksi sel Hela dapat menginduksi protein *c-myc* yang dapat memacu enzim telomerase dan akibatnya sel bersifat imortal.. ekstrak kulit batang *B gymnorhiza* mungkin mengandung senyawa yang

dapat menghambat aktifitas Protein E₆ dan E₇ sehingga enzim telomerase terhambat aktifitasnya dan sel mati .

Seluruh kemungkinan mekanisme tersebut masih perlu diteliti kebenarannya, dan juga adanya mekanisme lain dan kiranya akan menjadi topik yang menarik untuk penelitian yang akan datang.

DAFTAR PUSTAKA

- Cardenas ME, Sanfridson A, Cuter NS, and Heitman J, 1998, Signal Transduction Cascade as targets For Therapeutics Intervention by natural Products. Tibtech. Vol 16. October, 427 - 433
- Dai, M. 2003. Uji aktivitas anti proliferasi Pentagamavunon-O Terhadap sel Raji, sel HeLa dan Sel Myeloma. Tesis. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta (tidak dipublikasikan).
- Dean M. 1998. Cancer as a Complex development Disorder. *Cancer Res* 58: 5633 – 5636
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M. and Thiery, F., 1999, Papillomavirus E2 Induces p53-independent Apoptosis in Hela Cells, *Oncogene* 18, 4583-4545
- Gibbs Jb. 2000. Anticancer Drugs Targets, Growth Factors and growth factor Signaling. *J Clin Inves*, 105 (1) 9- 13
- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell* Vol 100: 57 –70
- Harborne JB, 1987, metode Fitokimia Penuntun Modern menganalisis tumbuhan, Edisi II, Penerbit ITB. Bandung

Saphiro GI and Harper JW. 1999. Anticancer Drugs Targets, Cell Cycle and Checkpoint Control. *J Clin Inves.* 104(12) 1645-1676

Sasaki.S,2001. Development of Novel Telomerase Inhibitor Based on A Bisindole Unit, *Bioorg, Med. Chem. Lett.* 11, 583-585

Sonlimar, M., Sismindari and Mustofa. 2002. Uji Sitotoksik in Vitro Ekstrak Kloroform *Brucea javanica* L. (Meer), *Ipomoea batatas* Poir, *Mussaenda pubescens* Ait.f., dan *Portulaca oleracea* L., terhadap Sel HeLa. *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 (3), 132-141