

EFEK ANTIPROLIFERASI DAN PEMACUAN APOPTOSIS ISOLAT 5 FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK PETROLEUM ETER DAUN MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*, Boerl) PADA TURUNAN SEL KANKER RAHIM (HeLa)

Dwi Utami

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

Abstrak

Mahkota dewa Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl telah dikenal oleh masyarakat dan digunakan secara tradisional untuk pengobatan kanker. Ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel kanker serviks manusia (HeLa) dengan IC₅₀ 9 µg/ml. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antiproliferasi dan pemacuan apoptosis isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter terhadap sel kanker serviks manusia (HeLa). Serbuk daun mahkota dewa disari dengan alat Soxhlet dengan petroleum eter, kemudian difraksi dengan etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dilakukan kromatografi preparatif dengan fase gerak heksana : etil setat (9:1). Aktivitas sitotoksik dan antiproliferasi terhadap sel HeLa ditetapkan harga LC₅₀ dan doubling time melalui uji sitotoksik dengan metode hitung langsung dan MTT. Pemacuan apoptosis ditetapkan secara kualitatif dengan metode pengecatan akridin orange. Hasil isolasi dengan kromatografi preparatif diperoleh lima isolat masing-masing dengan harga R_f : 0,05 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,60 ; dan 0,90. Aktivitas sitotoksik yang ditetapkan dari harga LC₅₀ isolat 5 (R_f : 0,90) sebesar 123,601 µg/ml. Isolat 5 mampu menghambat proliferasi sel pada kadar 125 µg/ml. Isolat 5 juga mampu memacu terjadinya apoptosis pada kadar 160 µg/ml.

Kata kunci : *Isolat, Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl, apoptosis, sel HeLa, petroleum eter*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang dicirikan dengan keadaan sel yang tumbuh secara terus menerus tanpa kontrol dan mempunyai kemampuan untuk menyebar (bermetastasis) ke jaringan lain secara patologi (Azimahtol Hawariah, 1998). Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan merupakan penyakit pembunuh terbesar kedua setelah kardiovaskuler. Menurut laporan WHO tahun 2002, terdapat lebih dari 10 juta kasus kanker per tahun di dunia (Surh, 2003). Di Indonesia, penyakit kanker menjadi penyebab kematian keenam (Siswono, 2005). Dari tahun ke tahun penderita penyakit kanker jumlahnya terus meningkat termasuk di Indonesia dimana peningkatannya mencapai 190 ribu penderita kanker baru per tahun (Mariono dkk., 2002).

Di antara jenis kanker pada wanita, kanker leher rahim (serviks) merupakan jenis kanker maligna yang paling sering menyerang wanita, khususnya di negara-negara berkembang (Cronje, 2004) dengan jumlah penderita sebanyak 40 orang setiap 100.000 orang. Jumlah pengidap kanker serviks di Indonesia diperkirakan antara 25-40 orang penderita setiap 100.000 orang per tahun (A. de Boer dkk, 2004).

Terapi konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker serviks antara lain dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku, 2002). Namun terapi pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sedangkan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping meskipun kemoterapi mampu mengeluarkan keseluruhan sel-sel tumor (Azimahtol Hawariah, 1998).

Kegagalan dalam kemoterapi ini biasanya berkaitan dengan kegagalan agen antikanker tersebut untuk menginduksi kematian sel kanker secara terprogram (apoptosis) (Fisher, 1994). Karena itu, usaha pencarian agen kemoterapi baru yang mampu menginduksi kematian sel kanker secara apoptosis dengan memberikan efek samping minimum sangat diperlukan dalam terapi kanker serviks, yaitu dengan me-

ngembangkan senyawa dari bahan alami sebagai agen kemoterapi.

Mahkota dewa telah dikenal oleh masyarakat dan digunakan secara tradisional untuk pengobatan kanker. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel kanker serviks manusia (HeLa) dengan IC_{50} 9 $\mu\text{g/ml}$ (Kintoko & Azimahtol Hawariah, 2007). Fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 25,409 $\mu\text{g/mL}$ (Sahara, 2010). Fraksi kloroform ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 71,83 $\mu\text{g/mL}$ (Kurniawati, 2010). Fraksi n-heksan ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 209,196 $\mu\text{g/mL}$ (Maulida, 2010). Fraksi metanol-air ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 431,635 $\mu\text{g/mL}$ (Pratama, 2010). Hasil isolasi dari fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan harga LC_{50} sebesar 123, 601 $\mu\text{g/mL}$. Guna mengetahui mekanisme penghambatan pertumbuhan turunan sel kanker maka perlu dilakukan penelitian antiproliferasi dan pemacuan apoptosis dari isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama penelitian ini adalah serbuk kering daun mahkota dewa. Bahan kimia yang diperlukan seperti pelarut untuk ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi adalah petroleum eter, etil asetat derajat teknis dan *pro analysis*, aquadest dan silika gel F₂₅₄ yang diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi Fitokimia UAD. Sel HeLa, sel Vero, media DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle medium*), DMSO, PBS (*Phospat Buffered Saline*), Penisillin-Streptomisin 2%, Fungison 0,5%, FBS (*Fetal*

bovine serum) 10%, Trypsin-EDTA 0,25% dalam PBS, SDS (*Sodium dodecyl sulfat*) 10% dalam HCl 0,01 N, NaHCO₃ teknis dan HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazin-N-2ethane sulfonic acid) teknis, dan *tripan blue*.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, gelas ukur, gelas beker, alat sokhlet, kertas saring, *vaccum rota evaporator*, penangas air, cawan porselin, pengaduk, plastik, karet pengikat, dan almari es, corong pisah, corong *buchner*, flakon dan kertas saring, autoclave, incubator CO₂, lampu UV, *laminar air flow cabinet*, *tissue culture flask*, tabung conical, *microplate* 96 sumuran, haemocytometer, *microplate* 24 sumuran (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), neraca elektrik (Sartorius), mikropipet (Gilson), *cover slip*, *cover glass*, mikroskop fluoresense, *cell counter*, ELISA reader, *magnetic stirrer*, mikroskop, pipet, neraca analitik, kamera digital, dan lemari es.

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl sesuai dengan metode isolasi yang dilakukan Utami, 2011
2. Uji sitotoksisitas terhadap sel HeLa dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan Utami, 2011
3. Uji kinetika proliferasi dengan metode MTT

Sel distarvasi (dipuasakan) selama 24 jam dalam media kultur yang mengandung FBS 0,5%. Selanjutnya sel ditumbuhkan di dalam *plate* 96 sumuran (*multiple dishes*) dengan medium ditambah sampel dengan konsentrasi yang tidak mematikan (dibawah nilai *IC₅₀*), sampling dilakukan pada jam 24, 48 dan 72. Masing-masing sumuran dihitung jumlah sel yang hidup dengan metode MTT dan dibuat kurva absorbansi vs waktu inkubasi.

Pengamatan apoptosis dengan akridin orange

Sel didistribusikan ke dalam sumuran *plate* 24 well dengan kadar dan diinkubasi 24 jam bersama isolat 5 dengan kadar 160,000 µg/mL. Inkubasi selama 24 jam dalam *microplate* 96 sumuran. Selanjutnya sel dan isolat yang telah diinkubasi selama 24 jam dicuci dan disedot habis dengan PBS 500 µL sebanyak 2 kali kemudian dibuang. Sel yang melekat dalam *plate* 24 well ditambah dengan tripsin sebanyak 200 µL tiap sumuran, kemudian disedot habis masukkan ke dalam eppendorf. Sisa yang terdapat dalam *plate* ditambahkan dengan media sebanyak 100 µL dan PBS sebanyak 500 µL ke dalam tiap sumuran. Cairan yang terdapat dalam eppendorf tersebut kemudian disentrifuge selama 10 menit 5000 rpm. Cairan dalam eppendorf dibuang dan pellet diambil. Pelet ditambahkan dengan akridin orange sebanyak 100 µL ke dalam masing-masing isolate. Cairan diambil dan dimasukkan dalam kaca untuk dilihat dalam mikroskop flouresen.

HASIL PEMBAHASAN

Hasil determinasi daun mahkota dewa adalah

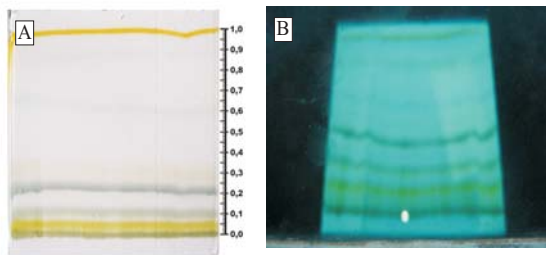
1b – 2b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27b – 799b – 800b – 801b – 802b – 803b – 804b – 805b – 806b – 807b – 808b – 809b – 810b – 811b – 812b – 815b – 816b – 818b – 820b – 821b – 822b – 823b – 825b – 826b – 829b – 830b – 831b – 832b – 833b – 834a – 835a – 836a – 837c – 851a – 852b – 853b – 854a – 855c – 856b – 857b – 872b – 874b – 875b – 876b – 877d – 933b – 934a – 935b – 936b – 937a – 938c – 939a – 940a – 941b – 942b Thymelaceaceae

1a Phaleria

1a – 2b *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl

(Backer and Van Den Brink, 1965)

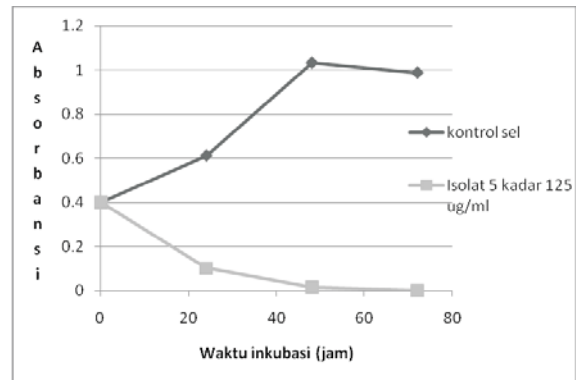
Berdasarkan hasil determinasi di atas maka dapat ditarik kesimpulan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl).



Gambar 1. Profil KLT preparatif fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
 Fase diam : Silika gel GF254, Fase gerak heksana-etil asetat (9:1)
 A. Sinar tampak

Hasil KLT-preparatif fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksana : etil asetat (9 : 1) menghasilkan 5 pita seperti terlihat pada gambar 1. Pita 1 dengan harga Rf : 0,05 selanjutnya disebut sebagai isolat 1, pita 2 dengan harga Rf : 0,10 (isolat 2), pita 3 dengan harga Rf : 0,20 (isolat 3), pita 4 dengan harga Rf 0,60 (isolat 4) dan terakhir pita 5 dengan harga Rf : 0,90 disebut sebagai isolat 5.

Berdasarkan penelitian Utami, 2011, isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter



Gambar 2. Grafik pengaruh isolat 5 terhadap kinetika proliferasi sel HeLa dibandingkan terhadap kontrol.

daun mahkota dewa memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel Hela dengan harga LC₅₀ 123, 601 µg/ml. Aktivitas antiproliferasi isolat diuji dengan pengamatan kinetika proliferasi pada waktu 24, 48 dan 72 jam dengan metode MTT guna melihat jumlah sel yang setara dengan absorbansi seperti terlihat pada Tabel II. Gambar 2 menunjukkan pada kontrol sel absorbansi (jumlah sel hidup) mengalami kenaikan. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin

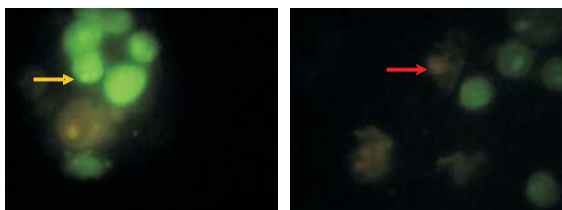
Tabel I. Hasil KLT preparatif Fraksi Etil Asetat

Nama Bercak	Harga Rf	Detektor	
		Visual	254 nm
Isolat 1	0,05	Kuning	Tidak Fluoresensi biru
Isolat 2	0,10	Biru muda	Fluoresensi biru lemah
Isolat 3	0,20	Biru muda	Fluoresensi biru lemah
Isolat 4	0,60	Biru	Fluoresensi biru
Isolat 5	0,90	Biru tua	Fluoresensi biru

Tabel II. Kinetika proliferasi sel HeLa pada jam ke 24, 48 dan 72 dengan perlakuan isolat 5.

	Konsentrasi	Absorbansi pada jam pengamatan ke-			
		0	24	48	72
Kontrol sel		0,402	0,612	1,0337	0,989
Isolat 5	160, 0 ?g/ml	0,402	0,102	0,016	0

meningkat pula jumlah sel yang hidup. Pada perlakuan isolat 5 terjadi penurunan jumlah sel yang sangat pesat pada jam ke-24, diduga sel mengalami lag time atau fase adaptasi. Pada jam ke-48 dan jam ke-72 menurun tajam. Hal ini dapat disebabkan karena sel mengalami kematian. Kematian ini dapat melalui mekanisme arrest (siklus sel berhenti) dulu baru mengalami apoptosis atau langsung mengalami apoptosis. Dengan terhentinya siklus sel maka sel tidak dapat menggandakan dirinya.



Gambar 3. Fotomikroskopis hasil deteksi Apoptosis metode pengecatan dengan akridin-orange pada sel HeLa : Kontrol (A) dan Isolat 5 kadar 160 µg/ml (B).

→ = sel normal
→ = sel yang mengalami apoptosis

Hasil pengujian apoptosis dengan metode pengecatan akridin-orange pada perlakuan dengan isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) ini terlihat adanya fragmen sel yang lebih kecil ukurannya dan berfluoresensi warna merah (Gambar 3). Secara kualitatif hal ini menunjukkan potensi pemacuan kematian sel melalui kematian sel terprogram selain menunda proliferasi sel.

Mekanisme penghambatan proliferasi dan pemacuan apoptosis kemungkinan melalui protein-protein pengatur proliferasi dan apoptosis seperti up-regulasi protein pro apoptosis Bax dan menginduksi aktivitas caspase-caspase sebagai mesin penggerak program apoptosis (Faried dkk), selain itu juga menurunkan regulasi protein anti apoptosis Bcl-2 dan Xiap. Ataupun melalui pembentukan fragmentasi DNA, penurunan ekspresi Bcl

mRNA dan menaikkan ekspresi Bax mRNA (Tjandrawinata, dkk, 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Aktivitas sitotoksik isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) adalah sebesar 123,601 µg/ml (LC₅₀)
2. Isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) mampu menghambat proliferasi sel.
3. Isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) mampu memacu apoptosis pada kadar 160 µg/ml.

Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap isolat hasil KLT preparatif, dengan kromatografi kolom ataupun HPLC.
2. Perlu dikaji lebih lanjut mekanisme penghambatan pertumbuhan sel HeLa secara molekuler melalui uji imunositokimia terhadap enzim, protein ataupun gen yang berperan dalam proliferasi ataupun apoptosis.

DAFTAR PUSTAKA

- A. de Boer, M., A.W. Peter, L., Aziz, M.F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M.A., S. Jordanova, E., Uljee, S.K. and Fleuren, G.J. 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 variant in cervical cancer in Indonesia, Suriname, Netherland. *Gyn. Oncol.* **94**:488-494.
- Apantaku, L.M. 2002. Breast-conseving surgery for breast cancer *Am.Fam.Physician* **66**(12): 2271-2278.

- Azimahtol Hawariah, L.P. 1998. *Kanker Payudara*. Serdang: Penerbit Universiti Putra Malaysia.
- Cronje, H.S. 2004. Screening of cervical cancer in developing countries. *Int. J. Gyn and Obst.* **84**: 101-108.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2006, Anticancer Effects of Gallic Acid Isolated from Indonesian Herbal Medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on Human Cancer Cell Lines : *International Journal of Oncology, Padjadjaran University Faculty of Medicine, Bandung*
- Kurniawati, Anisa, 2010, Sitotoksisitas Fraksi Kloroform Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel Hela dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
- Kintoko & Azimahtol Hawariah. 2007. Antiproliferative effect of extract of mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] on selected cancer cell line and its mode of cell death. *Proceeding of the 1st International Conference on Chemical Science*.
- Mariono, S.A., Jusuf, A., Kresno, S.B. 2002. Karakteristik kandungan DNA dan aktivitas proliferasi pada kanker paru di Jakarta. *Cermin Dunia Kedokteran.* **127**: 15-17.
- Maulida, Nisa, A., 2010 Sitotoksisitas Fraksi n-Heksan Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel Hela dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Pratama, Anton, 2010, Sitotoksisitas Fraksi Metanol-Air Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl) terhadap Sel Hela dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Sahara, Nasa Milta, 2010, Uji Sitotoksisitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Petroleum Eter Daun Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* Scheff. Boerl) terhadap Sel Hela dan Sel Vero beserta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Siswono. 2005. Setiap tahun 190 ribu penderita kanker baru. <http://www.gizi.net> [12 November 2006].
- Surh, Y.J, 2003, Cancer Chemoprevention with Dietary Phytochemicals, *Nature Reviews Cancer* **3**: 768 – 780.
- Tjandrawinata RR, Arifin PF, Tandrasasmita OM, Rahmi D, Aripin A, 2010, DLBS1425, a *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Extract confers antiproliferative and proapoptosis effects via eicosanoid pathway, *J. Ther. Oncol* : **8** (3) : 187-201.
- Utami, Dwi, 2011, Aktivitas Sitotoksik Isolat 5 Fraksi Etil Asetat Ekstrak Petroleum Eter Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada Turunan Sel Kanker Serviks Manusia (HeLa), *Jurnal Ilmiah Kefarmasian Pharmaçiana, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta*.