

EKSPRESI COX-2 SEL KANKER PAYUDARA T47D OLEH PENGARUH FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma Longifolia*, Jack)

Laela Hayu Nurani

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

Abstrak

Kanker payudara masih memiliki insidensi dan mortalitas yang tinggi. Antikanker dari alam dianggap merupakan pilihan terapi yang lebih baik. Penelitian ini bertujuan mengkaji aktivitas antikanker fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi secara in vitro melalui kajian aktivitas sitotoksik melalui penurunan ekspresi COX-2. Identifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalamnya perlu dikaji untuk penelusuran lebih lanjut senyawa aktifnya. Penyarian 250 gram simplisia akar pasak bumi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol sebanyak 500 ml sebanyak 3 kali. Hasil penyarian disaring kemudian dipekatkan dan dilakukan fraksinasi dengan etil asetat sebanyak 5 kali dengan masing-masing 50 ml, diambil fraksi larut etil asetat. Fraksi dipekatkan dan diuji pada pengaruh terhadap ekspresi COX-2 pada sel T47D. Metode pengujian dengan pengecatan imunositokimia dengan konsentrasi fraksi etil asetat 60,23 µg/ml. Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan menggunakan uji tabung untuk saponin dan kromatografi lapis tipis untuk flavonoid dan alkaloid. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 60,23 µg/ml dapat menurunkan ekspresi COX-2 pada sel T47D dari $43,56 \pm 7$ menjadi $14,58 \pm 3$ atau sebesar 33,47 % dari semula. Golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol akar pasak bumi adalah saponin, flavonoid, dan alkaloid.

Kata kunci : *Eurycoma longifolia Jack, COX-2, fraksi etil asetat, ekstrak etanol, imunositokimia*

PENDAHULUAN

Kanker payudara memiliki insidensi yang sangat tinggi di seluruh dunia. Di Indonesia, insidensi kanker payudara menduduki peringkat dua (12,10%) setelah kanker leher rahim (17,77%) (Tjindarbumi and Mangunkusumo, 2002). Kanker dapat terjadi oleh terpacunya COX-2 di dalam tubuh. Ekspresi COX-2 terinduksi oleh berbagai stimulan inflamasi atau mitogenik serta bertanggung jawab pada biosintesis prostaglandin yang terlibat pada reaksi inflamasi dan rasa nyeri.

Penanganan kanker dengan kemoterapi, penyinaran, serta pembedahan. Kelemahan dari penanganan kanker memacu para peneliti untuk mencari agen antikanker. Agen antikanker dari alam dianggap merupakan pilihan terapi yang memiliki prospek yang baik. Antikanker dari bahan alam dianggap lebih aman dan kecenderungan masyarakat untuk *back to nature* semakin besar (Kelloff, *et al.*, 2000; Sugiyanto *et al.*, 2003). Target molekuler agen antikanker antara lain melalui penghambatan proliferasi sel kanker dan pemacuan proses apoptosis (Dorai and Aggarwal, 2004).

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker adalah akar pasak bumi. Pasak bumi atau dikenal dengan nama tongkat ali termasuk ke dalam famili Simarubaceae. Akar pasak bumi mengandung kuasinoid, alkaloid dan flavonoid, ketiga senyawa tersebut telah lama diteliti berefek sebagai antikanker melalui berbagai mekanisme (Kardono *et al.*, 1991; Itokawa *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005; Miyake *et al.*, 2010; Kurniawati, 2009; Kusmaharani, 2009).

Akar pasak bumi memiliki efek sitotoksitas yang poten terhadap beberapa sel kanker dan kurang toksik terhadap sel normal (Kuo, *et al.*, 2003; Nurhanan *et al.*, 2005; Mahfudh and Hawariah, 2008). Ekstrak akar pasak bumi telah diteliti memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara. Ekstrak metanol, butanol, kloroform dan ekstrak air akar pasak bumi menghasilkan IC50 pada sel kanker payudara T47D masing-masing sebesar 8,6;

33,4; 21,7 µg/ml dan paling besar pada ekstrak airnya dengan IC50 > 100 µg/mL (Nurhanan *et al.*, 2005). Ekstrak etanol akar pasak bumi juga diketahui memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D (Nurani, 2008).

Aktivitas antikanker pasak bumi dihubungkan melalui mekanisme penghambatan proliferasi dan pemacuan apoptosis. Ekstrak pasak bumi memiliki aktivitas antiproliferasi pada sel kanker payudara MCF-7 serta memacu apoptosis melalui penghambatan ekspresi gen bcl-2 dan pemotongan penghambatan caspase-7 (Tee and Hawariah, 2005). Eurycomanon diteliti mampu memacu apoptosis sel kanker rahim HeLa melalui peningkatan ekspresi gen p53 dan bax yang diikuti oleh penurunan ekspresi gen bcl-2 (Mahfudh and Hawariah, 2008).

Pada penelitian ini dilakukan penelusuran mekanisme antiproliferasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) terhadap sel kanker payudara T47D berdasarkan gambaran imunositokimia pada ekspresi COX-2.

METODE PENELITIAN

Bahan

Etanol 70%, etil asetat, akar pasak bumi yang diambil dari pasar Beringharjo, *cell line* T47D (koleksi Dr. Edy Meiyanto, M.Si., Apt. yang diperoleh dari Prof. Tatsuo Takea, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang), medium RPMI 1640, medium PRF (*phenol red free*) RPMI 1640, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) - 0,5 % fungison - 2 % antibiotik penisilin dan streptomisin (GIBCO), DMSO, natrium karbonat (E.Merck), kertas saring 0,2 µm, aquadest, hepes, dan tripsin (Sigma), *Phospat Buffered Saline* (PBS), 5 mg/mL PBS, larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10 % dalam aquadest, *mounting fluid*, dan ksilen (E.Merck), akuades, *blocking serum*, Abm COX-2, *secondary* antibodi, streptavidin, DAB, alkohol 95%, amoniak, dan dragendorf.

Alat

Serutan, maserator, motor pengaduk, corong buchner, tangas air, cawan porselen, tangki nitrogen cair, mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80), mikroskop (Nixon YS 100), sentrifus Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), inkubator CO2 (NAPCO model 6200), Laminar air flow cabinet (Delta series), ELISA reader (Bench mark), hemocytometer (Nebauer), tabung conical steril (Nunclone), tissue culture flask (Nunclone), plate, mikroplate 96 sumuran (Nunclone), mikropipet (Gilson), vorteks (Genie), timbangan elektrik (Sartorius), kamera digital (MPIC 7.0 MGFX), mikroskop, optilap, komputer, plate, deck glass, dan Chamber kromatografi.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk akar pasak bumi sebanyak 500 gram dimaserasi dengan etanol 70% 2,5 L selama 24 jam sehingga diperoleh ekstrak kental akar pasak bumi sebanyak 6,5 gram. Selanjutnya dilakukan fraksinasi ekstrak etanol menggunakan 250 mL etil asetat menghasilkan fraksi etil asetat akar pasak bumi sebanyak 1,0187 gram.

Immunositokia

Sel (kepadatan 3×10^4 sel/1000 μ L) ditanam pada *coverslips*, kemudian diinkubasi sampel uji kadar 57,34 μ g/mL. *Coverslips* diberi perlakuan pengecatan COX-2. Sel ditambahkan DAB dan hematoxillin kemudian diberi *mounting fluid*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 10x.

Identifikasi golongan senyawa

Untuk mengetahui kandungan golongan senyawa dalam fraksi etil asetat maka dilakukan uji tabung dan kromatografi lapis tipis. Uji tabung : Fraksi kental dilakukan untuk mengidentifikasi saponin. Uji kromatografi dimulai dengan penotolan fraksi dalam kertas Whatman dan kemudian dielusi menggunakan butanol:asam asetat:air (3:1:1 v/v) untuk

flavonoid. Fase diam untuk identifikasi golongan alkaloid dengan fase gerak kloroform:etanol: air (7:3:1 v/v). Deteksi golongan alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff dan flavonoid dengan uap amoniak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim siklooksigenase (COX-2) merupakan enzim pengkatalis dalam proses metabolisme terbentuknya prostaglandin. Prostaglandin adalah produk metabolisme asam arakidonat yang merupakan mediator inflamasi. Prostaglandin diperlukan dalam system tubuh manusia, namun jika diekspresikan berlebihan dapat memacu tumorigenesis. Selain meningkat pada proses inflamasi, overekspresi COX-2 juga ditemukan pada banyak tipe pre-malignan dan malignan neoplasma pada manusia dan organisme lain. Tempat tumbuhnya tumor adalah juga tempat berlangsungnya inflamasi, yang ditandai dengan peninggian kadar COX-2 misal pada kanker payudara, paru (Hu *et al.*, 2003), serta kolorektal (Moore and Simmons, 2000). Prostaglandin hasil aktivitas COX-2 terlibat dalam karsinogenesis melalui perangsangan proses proliferasi sel, angiogenesis, dan penghambatan apoptosis (Koki and Masferrer, 2002).

Ekspresi COX-2 sel kanker payudara T47D diamati dengan pengecatan immunositokimia menggunakan antibodi yang dilabel enzim *horseradish peroxidase*. Enzim ini akan bereaksi dengan kromogen DAB menjadi substrat berwarna coklat. Sel dengan ekspresi positif akan berwarna coklat/gelap oleh DAB, sedangkan sel dengan ekspresi negatif akan berwarna ungu atau biru oleh *counterstain* hematoxilin (Melannisa, 2004).

Pengujian immunositokimia fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dilakukan pada konsentrasi 60,23 μ g/ml. Hal ini dilakukan atas dasar harga tersebut merupakan harga IC50 fraksi etil asetat terhadap sel T47D (Nurani *et al.*, 2009). Hasil pengamatan ekspresi protein p53 dan bcl-2 pada sel T47D sebelum dan setelah diberi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak

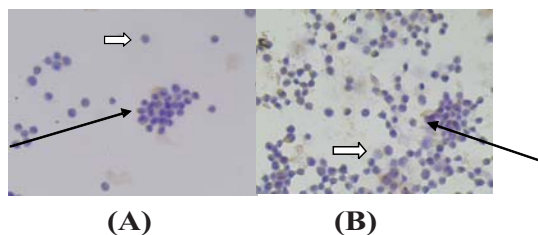
bumi menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi COX-2 (Tabel I).

Tabel I. Ekspresi COX-2 sel T47D oleh pengaruh fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi

Konsentrasi	Rata-rata persen ekspresi
60,23 µg/ml	14,58 ± 3
0 % (kontrol)	43,56 ± 7

Untuk mengkaji ekspresi COX-2 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat yang bermakna, maka data kemudian dianalisis dengan metode uji t. Hal ini dilakukan untuk membandingkan perlakuan satu dengan yang lain. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ekstrak uji mampu menekan ekspresi COX-2 secara berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol.

Penurunan COX-2 oleh pengaruh fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi merupakan informasi yang melengkapi mekanisme akar pasak bumi sebagai antikanker. Karsinogenesis dapat terjadi dengan adanya angiogenesis. Angiogenesis, pembentukan pembuluh darah kapiler baru, tidak hanya dibutuhkan untuk pertumbuhan dan metastase tumor, tetapi juga penyembuhan luka dan tukak, sebab tanpa aliran darah yang baik, oksigen dan nutrisi tidak dapat dihantarkan ke tempat yang mengalami inflamasi. Bila angiogenesis tidak dihambat, proses inflamasi terus berlanjut diikuti dengan perjalanan nyeri kanker menjadi kronis dan lebih parah. Adanya penurunan COX-2 maka proses nyeri kanker dapat dihilangkan dan proses

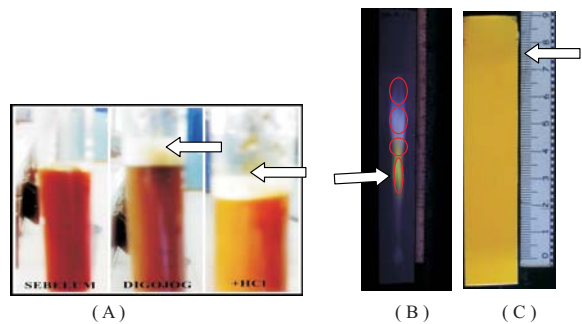


Gambar 1. Fotomikroskopis hasil immunositokimia COX-2 sel T47D oleh pengaruh fraksi etil asetat akar pasak bumi (A) dan kontrol (B), perbesaran 100x

karsinogenesis dapat dihambat. Gambar ekspresi COX-2 sel T47D terlihat pada Gambar 1.

Kandungan golongan senyawa dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi adalah saponin, flavonoid, dan alkaloid. Hasil uji tabung dan kromatografi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi tersaji pada Gambar 2. Saponin dideteksi dengan penggojogan menimbulkan buih jika positif terdapat dalam sampel. Buih terbentuk karena sifat saponin yang seperti sabun (Robinson, 1991). Flavonoid dapat dideteksi dengan uap amoniak dan untuk alkaloid dideteksi menggunakan detector dragendorf (Jork, *et al.*, 1990).

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terdapat buih yang stabil setelah digojog dan ditambah dengan HCl. Flavonoid terdeteksi dengan detektor uap amoniak dikarenakan terbentuk garam fenolat dengan kromofor yang lebih panjang sehingga warnanya lebih intensif. Alkaloid terbentuk oleh adanya reaksi adisi alkaloid dan bismuth nitrat dalam dragendorf menghasilkan suatu senyawa yang tampak dalam KLT atau endapan dalam uji tabung (Samsumaharto *et al.*, 2011).



Gambar 2. Hasil uji saponin, flavonoid, dan alkaloid fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (A) uji tabung saponin (B) Kromatogram flavonoid, (C) Kromatogram alkaloid

Flavonoid luteolin dilaporkan dapat menghambat ekspresi COX-2 pada sel RAW 264,7 (Harris *et al.*, 2004). Singh *et al.*, 2011 melaporkan bahwa alkaloid berberine dapat menghambat sel melanoma melalui mekanisme

penghambatan ekspresi COX2. Dilaporkan juga bahwa saponin furostanol pada konsentrasi 20 ug/mL dapat menghambat ekspresi COX-2 (Zou, *et al*, 2007). Fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, dan saponin. Aktivitas antikanker fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) melalui penurunan persentase ekspresi protein COX-2 kemungkinan disebabkan oleh senyawa kuasinoid, alkaloid dan flavonoid.

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) konsentrasi 60 µg/ml dapat menurunkan ekspresi COX-2 pada sel T47D. Fraksi etil asetat mengandung golongan senyawa saponin, alkaloid, dan tannin.

DAFTAR PUSTAKA

- Singh, T., Vaid, M., Katiyar, N., Sharma, S., Katiyar, S.S., 2011, Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂ and prostaglandin E₂ receptors, *Carcinogenesis*, 32, 86-92,
- Chan, K.L., Choo, C.Y., Abdullah, N.R., Ismail, Z., 2004, Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*, *J Ethnopharmacol*, 92:223-7.
- Dorai, T., and Aggarwal, B.B., 2004, Role of chemopreventive agents in cancer therapy, *Cancer Lett*, 25;215(2):129-40.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A., Sindelar, R.D., 2005, Biological Active Quassinoids and Their Chemistry: Potential Leads for Drug Design, *Current Medicinal Chemistry*, 12: 173-190
- Harris, G.K., Qian, Y., Shi, X., 2004, Effects of the flavonoid luteolin on Cox-2 and PGE 2 expression in RAW 264.7 cells, *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 45, 2004, 435-437
- Hu, K., Yu, C., Mineyama, Y., McCracken, J.D., Hillebrand, D.J., and Hasan, M., 2003, Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor, *Int J Oncol*, 22, 757-763.
- Itokawa, H., Qin, X.R., Morita, H., Takeya, K., Iitaka, Y., 1993, Novel Quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Chem. Pharm. Bull*, 42(1): 403-405
- Jork, Urnk, Fischer, Wimmer, 1990, *Thin Layer chromatography*, Reagent and Detection Methods, VCH, Germany
- Kardono, L.B., Angerhofer, C.K., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1991, Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia*, *J Nat Prod*, 54(5):1360-7.
- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner J.L., Sigman, C.C., 2000, Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents, *Journal of Nutrition*, 130:467S-471S.
- Koki, A.T., and Masferrer, J.L., 2002, Celecoxib: A specific COX-2 inhibitor with anti cancer properties, *Cancer Control*, 9 (2), 28-35.
- Kuo, P.C., Shi, L.S., Damu, A.G., Su, C.R., Huang, C.H., Ke, C.H., Wu, J.B., Lin, A.J., Bastow, K.F., Lee, K.H., Wu, T.S., 2003, Cytotoxic and antimalarial beta-carboline alkaloids from the roots of *Eurycoma longifolia*, *J Nat Prod*.
- Kurniawati, L., 2009, Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Fraksi Larut Etil asetat Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma*

- longifolia* Jack), *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Kusmaharani, A., 2009, Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Fraksi Tak Larut Etil asetat Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Mahfudh, N., and Hawariah, L.P., 2008, Eurycomanone Induced Apoptosis Through The Up-Regulation of p53 in Human Cervical Carcinoma Cell, MedUnion Press, *Research Paper*.
- Melannisa, R., 2004, Pengaruh gv-1 pada sel kanker payudara T47D yang diinduksi 17 β -estradiol: kajian antiproliferasi, pemacuan apoptosis, dan antiangiogenesis, *Masters thesis*, Program Pendidikan Pasca sarjana Universitas Gajah Mada.
- Miyake, K., Tezuka, Y., Awale, S., Li, F., Kadota, S., 2010, Canthin-6-one alkaloids and a tirucallanoid from *Eurycoma longifolia* and their cytotoxic activity against a human HT-1080 fibrosarcoma cell line, *Nat Prod Commun*, 5(1):17-22.
- Moore, B.C., and Simmons, D.L., 2000, Cox-2 Inhibition, apoptosis, and chemoprevention by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, *Curr Med Chem*, 7, 1131-1144.
- Nurani, L.H., 2008, The cytotoxicity of Extract of *Eurycoma longifolia* Jack, Root on T47D Cell line, Proceeding, International Joint Symposium Frontier in Biomedical Science, 24th and 25th 2008, Faculty of Medicine Gajah Mada University Yogyakarta, Indonesia.
- Nurhanan, M.Y., Hawariah, L.P., Ilham, A., Shukri, M.A., 2005, Cytotoxic effects of the root extracts of *Eurycoma longifolia* Jack, *Phyther Res*, 19(11):994-6.
- Robinson, T., 1991, *Kandungan Organic Tumbuhan Tinggi*, terjemahan oleh Kosasih, Penerbit ITB, Bandung
- Samsumaharto, R.A., Harti, A.S., Yuansari, C.P., 2011, Deteksi alkaloid dalam kalus daun tapak dara dengan perlakuan kombinasi hormone NAA dan FAP pada kultur *in vitro*, *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., Jenie, U.A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol: 14, 216-225.
- Tee, T.T. and Hawariyah, A.L.P. 2005. Induction of apoptosis by *Eurycoma longifolia* Jack extracts. *Anticancer Research* 25: 2205-2214.
- Tjindarbumi and Mangunkusumo, 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 32:S17-S21.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. 1999. An Apaf-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* 274 (17): 11549-11556.