

Identifikasi Senyawa Antikanker dari Fraksi Kloroform Kulit Batang *Bruguiera gymnorhiza* dan Aktivitas Sitotoksiknya

Warsinah¹, Sismindari², Ratna Asmah Susidarti²

ABSTRACT: *Bruguiera gymnorhiza* is one of mangrove plant that has not been widely studied as potential anticancer compounds. Previous research noted that the methanol extract of the bark of *B. gymnorhiza* are cytotoxic towards HeLa cells. The purpose of this study was to determine the compounds in the chloroform fraction and cytotoxic activity in HeLa cells. Stem bark of *B. gymnorhiza* was extracted with methanol, further fractionation by partitioning method, using of the solvent n-hexane and chloroform. Fraction of chloroform was evaporated, then tested cytotoxic activity against HeLa cells by MTT method and apoptotic induction by double staining method. Fraction levels are used for 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 mg / mL with 24-hour incubation time. Subsequent fractions were identified by GC-MS method. The results showed that the chloroform fraction contains 21 compounds, 6 in the form of fatty acids and terpenoids that have anti-cancer cytotoxic activity (IC_{50}) of 134 μ g / mL with apoptotic mechanism.

Keywords: Apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, cytotoxic, Fractination, HeLa cell

ABSTRAK: *Bruguiera gymnorhiza* merupakan salah satu tanaman mangrove yang belum banyak diteliti senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* bersifat sitotoksik terhadap sel kanker HeLa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa dalam fraksi kloroform dan aktivitas sitotoksiknya pada sel kanker HeLa. Kulit batang *B. gymnorhiza* diekstraksi dengan metanol, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode partisi menggunakan pelarut n-heksan dan kloroform. Fraksi kloroform dievaporasi, kemudian diuji sitotoksiknya terhadap sel HeLa dengan metode MTT dan induksi apoptosis menggunakan metode double staining. Kadar fraksi yang digunakan sebesar 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 μ g/mL dengan waktu inkubasi 24 jam. Selanjutnya fraksi diidentifikasi dengan Gas Kromatografi Spektrum Massa (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan fraksi kloroform mengandung 21 senyawa, 6 diantaranya berupa asam lemak dan terpenoid yang bersifat antikanker dengan aktivitas sitotoksik (IC_{50}) sebesar 134 μ g/mL melalui mekanisme apoptosis.

Kata kunci: Apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, Fraksinasi, Sel HeLa, Vaksinasi sitotoksik.

¹ Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Unsoed Purwokerto

² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Korespondensi:

Warsinah

Email : warsinah@rocketmail.com

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu ancaman utama di bidang kesehatan di dunia kematian akibat penyakit kanker menduduki peringkat ke-2 setelah penyakit kardiovaskuler (1). Kematian akibat kanker di Indonesia mencapai 4,3% atau menduduki peringkat ke-6 (2).

Sel kanker merupakan sel yang tumbuh tidak terkendali dan lepas kontrol dari koordinasi pertumbuhan normal sehingga mengalami perubahan bentuk, sifat dan kinetiknya. Perubahan tersebut terjadi karena mutasi gen pengatur pertumbuhan dan diferensiasi proto-onkogen atau supresor gen (3).

Berbagai usaha dilakukan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kanker, salah satu usaha yang sedang intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antitumor dari bahan alam (4).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa bahan-bahan dari tanaman ternyata mempunyai potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen tumor supresor, sehingga berpotensi sebagai antikanker (5).

Mangrove merupakan tumbuhan yang hidup di pantai, dapat dijadikan sumber senyawa bio-aktif seperti golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktifitas antimikroba, fungi, virus, tumor, insektisida dan leukemia (6). Pemanfaatan tanaman mangrove sebagai bahan obat tradisional digunakan oleh masyarakat dalam terapi penyakit gastroenteritis dan anti kanker (7).

Chen, *et al.* (2007), melaporkan fermentasi akar *B. gymnorrhiza* dengan *Penicillium thomi* menghasilkan senyawa 4',5-dihidroksi-2-3-dimetoksi-4-(hidroksipropil)-biphenil bersifat sitotoksik terhadap 3 sel kanker (A549, HepG2 dan HT29). Homhual *et al.* (2006), Bunga *B. gymnorrhiza* mengandung senyawa sulfur yaitu senyawa cyclic 4-hidroksi-dithiosulfonat (bruguisulfurrol), hidroksidithiolane 1-oxida (bruguierol) dan isobruguirol dengan respon antioksidan dengan nilai EC_{50} 56,7; 3,7 dan 1,8 μ M. Senyawa brugui-

erol dan isobruguirol mampu menghambat phorbol-ester-induksi NF-kappaB (nuclear factor -kappaB) dengan IC_{50} 85 dan 14,5 μ M. Senyawa bruguierol juga mampu menghambat enzim COX-2 dengan IC_{50} 6,1 μ M.

Warsinah, *et al* (2005) melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorrhiza* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 301,78 μ g/mL dan sel Myeloma dengan IC_{50} sebesar 582 μ g/mL secara *in vitro* (12). Selanjutnya warsinah, *et al* (2007) menunjukkan bahwa ekstrak metanol mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan IC_{50} sebesar 228,8 μ g/mL (13).

Pencarian bahan obat antikanker dari alam umumnya ditekankan pada senyawa aktif yang memiliki kemampuan menekan proliferasi sel, mempunyai efek sitotoksik, antimitotik atau memiliki kemampuan menginduksi sel secara apoptosis. Kematian sel secara terprogram disebut apoptosis. Gen yang berperan dalam peristiwa apoptosis adalah gen P53, gen ini berperan sebagai supresor tumor (14). Senyawa antitumor yang baik adalah senyawa yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terdapat pada fraksi kloroform dan aktifitas sitotoksik dari kulit batang *Bruguiera gymnorrhiza* pada sel kanker leher rahim HeLa.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Tanaman *B. gymnorrhiza*, kultur HeLa, media RPMI (RPMI 1640 (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma) dan hepes (Sigma), fetal bovin serum (FBS) (Gibco) 10% (v/v), penisilin-streptomisin (Gibco) 1% (v/v), fungison (Gibco) 0,5% (v/v), aquades steril, DMSO, akridin oranye, etidium bromida, sodium dodesil sulfat (SDS), reagen stopper (natrium dodesil sulfat) (merck) 10% dalam HCl), MTT 5 mg/mL dalam FBS, dan semua pelarut pro analisis (E Merk).

Cara Kerja

Fraksinasi

Ekstrak kental metanol kemudian difraksinasi secara partisi dengan pelarut n-heksan dan kloroform. Fraksi kloroform tersebut kemudian di uji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker HeLa dengan metode MTT, induksi apoptosis dengan metode double staining dan identifikasi senyawa dengan GC-MS.

Identifikasi senyawa dengan GC-MS

Sampel dimasukkan kedalam system pemasukan cuplikan spectrometer massa, pada spektra massa yang terbentuk diamati bobot molekul beserta fragmen-fragmennya dibandingkan dengan spektra referensi.

Pembuatan larutan uji

Fraksi dibuat stok 10 mg/mL dengan dilarutkan dalam larutan DMSO 1,25%. Kemudian dibuat seri kadar sampel dalam media RPMI 1640 masing-masing dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 µg/mL. Pembuatan larutan

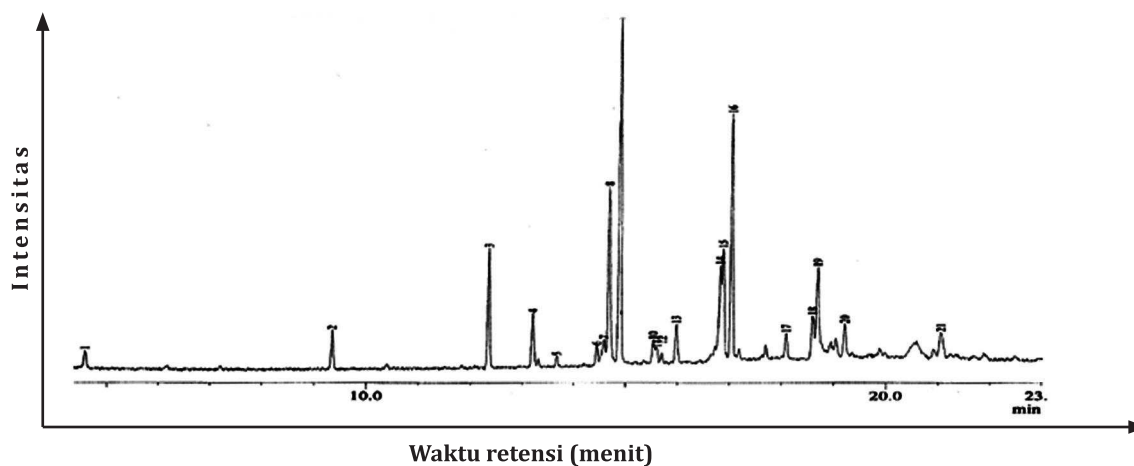
uji dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* secara aseptis.

Uji sitotoksis dengan metode MTT

Sel Kanker HeLa dengan kepadatan $2 \times 10^4/100$ uL didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate dan diadaptasikan, kemudian ditambah sampel uji dengan kadar masing-masing 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL dan 31,25 µg/mL. Sebagai kontrol digunakan 100 l suspensi sel ditambah media. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi ditambahkan 10 µl MTT 5 mg/mL dalam RPMI ke dalam sumuran. Kemudian diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan berwarna ungu setelah bereaksi dengan MTT, selanjutnya reaksi dihentikan dengan *reagen stopper* kemudian di inkubasi semalam pada suhu kamar, absorbansi dibaca dengan *ellisa reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Data

Data spectra dari hasil pembacaan GC-MS di-



Gambar 1. Kromatogram fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorrhiza*

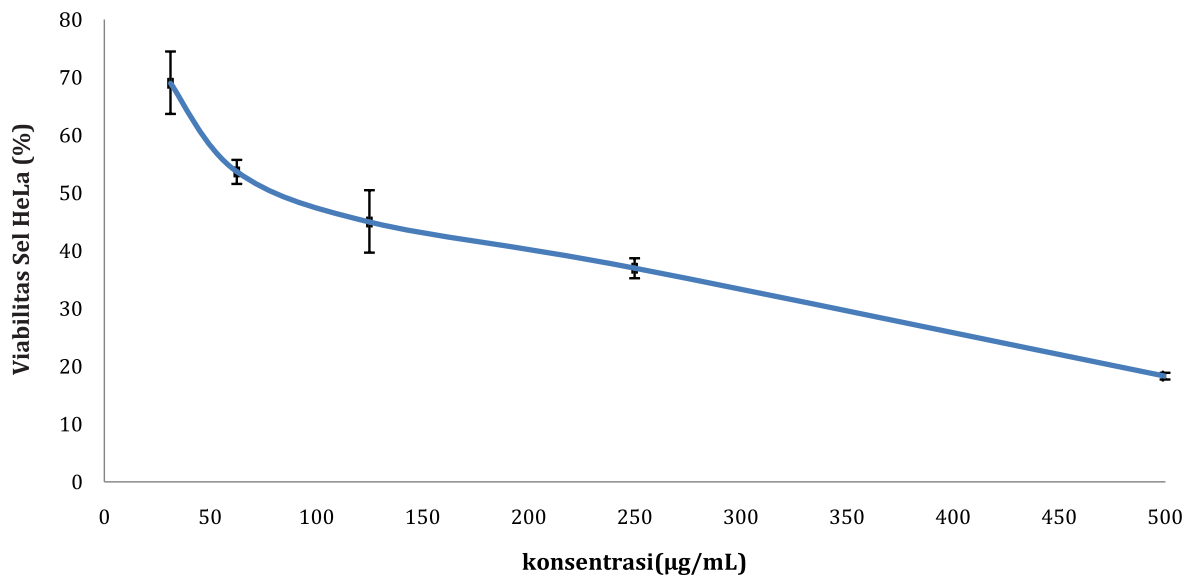
Tabel 1. Kandungan senyawa antikanker pada fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorrhiza*

No	No puncak	Waktu retensi	% area	Rumus molekul	Nama senyawa	Golongan senyawa
1	3	12,348	7,38	C15H30O2	Methyl myristat	terpenoid
2	4	13,197	3,41	C19H38O2	Methyl isostearat	Asam lemak
3	8	14,675	12,23	C17H32O2	Methyl palmitoleat	Asam lemak
4	9	14,880	21,05	C17H34O2	Methyl palmitat	Asam lemak
5	15	16,876	6,99	C19H36O2	Methyl oleat	Asam lemak
6	16	17,044	14,90	C20H40O2	Nonadecanoat	terpenoid

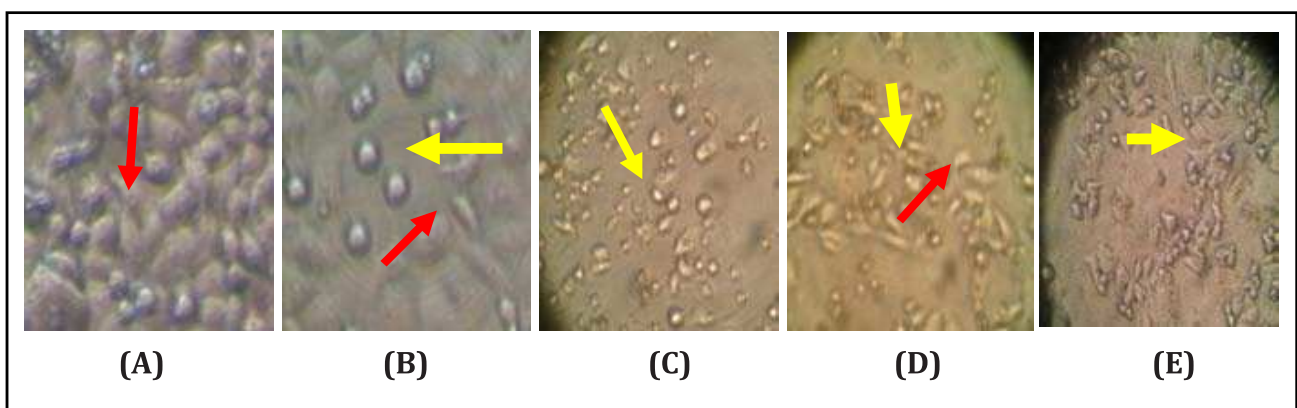
analisis secara deskriptif kualitatif dan data sitotoksik dari hasil pembacaan absorbansi *ELIZA Reader* dikonversikan dalam bentuk % sel hidup dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ hidup sel} = \frac{\text{Absorban sel perlakuan} - \text{Absorban media}}{\text{Absorban kontrol sel} - \text{Absorban media}} \times 100\%$$

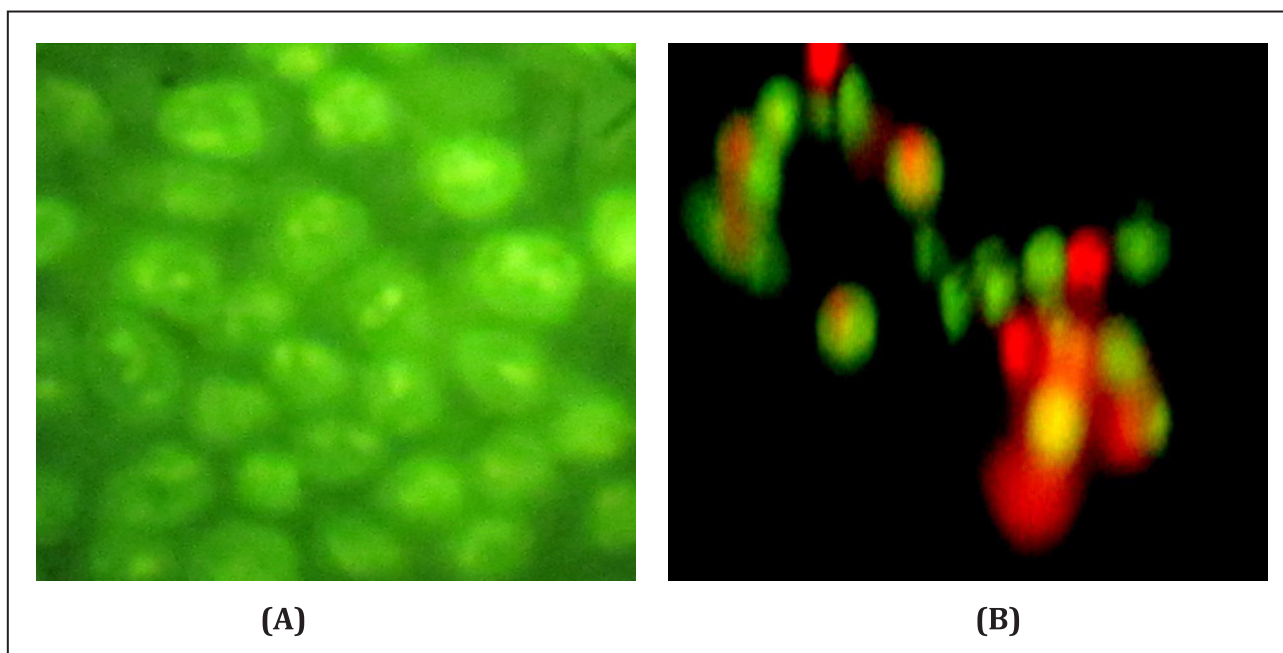
Potensi aktivitas sitotoksik direpresentasikan sebagai harga IC_{50} yang dihitung menggunakan analisis probit, semua data disajikan dalam bentuk mean \pm SD.



Gambar 2. Konsentrasi fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* terhadap viabilitas sel HeLa (%). Konsentrasi yang digunakan 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL µg/mL. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Jumlah sel yang hidup dihitung menggunakan metode MTT.



Gambar 3. Morfologi sel HeLa setelah inkubasi 24 jam. Sel kontrol (A), sel dengan perlakuan DMSO 1,25% (B), sel dengan perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* konsentrasi 500 µg/mL (C), 250 µg/mL (D) dan 125 µg/mL (E). sel hidup (panah merah) melekat didasar sumuran berbentuk helaian daun dan sel mati (panah kuning) sel mati berbetuk bulat, mengapung dan keruh. Pada perlakuan fraksi kloroform banyak ditemukan sel mati



Gambar 4. Morfologi sel HeLa dengan pengecatan DNA menggunakan metode double staining akridine orange - etidium bromida, pengamatan dilakukan dibawah mikroskop flouresens. (A) Sel kontrol memperlihatkan warna hijau terang yang sama dan berbentuk bulatan (panah merah) yang menandakan bahwa sel masih hidup, (B) perlakuan fraksi kloroform sel HeLa terlihat berwarna orange dengan bentuk yang tidak teratur (panah putih) yang mengindikasikan sel mengalami apoptosis

Fraksi kloroform tersebut kemudian diidentifikasi dengan GC-MS, Data kromatogram fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* ditampilkan pada gambar 1.

Dari kromatogram diketahui bahwa fraksi kloroform mengandung 21 senyawa, enam diantaranya bersifat antikanker (tabel 1).

Aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa

Hasil uji sitotoksik fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* pada kultur sel HeLa selama 24 jam memberikan hasil berupa penurunan sel hidup bersamaan dengan peningkatan kadar disajikan pada gambar 2. Dari kurva tersebut dibuat persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier yang didapat adalah $y = -0,0915x + 61,588$ dengan $R^2 = 0,9632$. Nilai IC_{50} dihitung secara interpolasi menggunakan rumus tersebut sehingga diperoleh angka 134 $\mu\text{g/mL}$.

Pada pengamatan morfologi sel HeLa kontrol terlihat melekat didasar sumran dengan bentuk helaian daun, demikian pula kontrol DMSO

1,25% memberikan bentuk seperti pada kontrol. Adanya perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* menyebabkan terjadinya perubahan morfologi sel HeLa. Sel yang mati berbentuk bulat, dan tampak keruh (gambar 3).

Selain itu perubahan sel juga dilihat secara morfologi, ternyata sel yang mati seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan pada sel uji. Hasil pengamatan morfologi sel dapat dilihat pada gambar 3.

Uji Induksi Apoptosis

Hasil uji induksi apoptosis dengan pengecatan DNA menggunakan metode double staining memperlihatkan warna hijau terang pada kontrol sel (gambar 4). Sel hidup yang masih mempunyai membran yang utuh, nukleusnya akan berwarna hijau terang (10), sedangkan pada sel dengan perlakuan fraksi kloroform (150 $\mu\text{g/mL}$) memperlihatkan warna yang tidak sama yaitu warna hijau bercampur orange yang mengindikasikan terjadinya apoptosis. Menurut Spector (1998), ada-

nya fragmentasi DNA sel kanker dengan pewarnaan etidium bromida menyebabkan terjadinya interkultasi antara DNA dengan zat warna etidium bromide sehingga sel mengalami apoptosis.

Potensi fraksi kloroform dalam memacu apoptosis sel kemungkinan karena adanya asam lemak dan senyawa terpenoid. Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan (12), bahwa didalam ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* mengandung senyawa terpenoid. Menurut Cassady *et al.* (1990). Diterpen dilakton mampu menghambat pertumbuhan *cell lung* tumor (A-549) dan sel kanker kolon secara invitro (15). Miao *et al* (2003) melaporkan bahwa senyawa diterpenoid kuinon salvacina memiliki aktivitas inhibitor pada enzim topoisomerase II dan mempunyai efek induksi apoptosis terhadap sel leukemia. Penelitian ini dilakukan menggunakan isolasi DNA total dan fragmentasi DNA diamati dengan metode elektroporesis. Apabila aktivitas topoisomerase dihambat maka stabilitas kompleks topoisomerase-DNA terpotong sehingga menimbulkan kerusakan permanen pada *double strand* DNA (17). Sukardiman (2005) melaporkan bahwa senyawa andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan senyawa diterpenoid yang memiliki gugus -OH bebas pada C-2, C-3 dan adanya gugus lakton

atau kuinon sebagai gugus fungsi yang bertanggung jawab pada proses ikatan reseptor dengan obat sehingga menyebabkan kematian sel kanker HeLa dengan mekanisme apoptosis (18). Willye (2000) mengatakan bahwa asam lemak dapat mematikan sel kanker dengan mekanisme apoptosis dan Cascady *et al* (1990), asam palmitat dan asam oleat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker *lung*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* mengandung 6 senyawa antikanker dan memiliki aktivitas antikanker dengan harga IC₅₀ sebesar 134 µg/mL melalui mekanisme apoptosis. Selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas terhadap ekspresi gen yang bertanggungjawab pada proses apoptosis sel kanker HeLa secara invitro.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan Kepada DP2M Ditjen DIKTI Kemendiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program penelitian Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Health Information for World. World Health Organisation. (online); 2005: <http://diahome.org/content/abstract/2005/dij991.pdf>.
2. Tjindarbumi D. and Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, Present and Future., Jpn J Clin Oncol. 2002. 32 (supplement 1). S17-S21
3. Sukardja IDG. Onkologi klinik Edisi II. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
4. Ma'at S. Obat Tradisional Untuk Pelayanan Kesehatan Formal. Prosiding Seminar Nasional Tanggal 5 September. Surabaya; 2004: 45-49.
5. Cardenas ME, Sanfridson A, Cuter NS, and Heitman J. Signal Transduction Cascade as targets For Therapeutics Intervention by natural Products. Tibtech. 1998 Oct. 16. 427 - 433
6. Soetarno, S. Potensi dan Manfaat Tumbuhan Mangrove sebagai Sumber Bahan Bioaktif. Acta Pharmaceutica Indonesia. 2000. 12(4). 84- 103.
7. Saputra K, Ma'at S, and Soedoko, R. Terapi Biologi Untuk Kanker. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
8. Chen G, Zhu Y, Wang HZ, Wang SJ, Zhang RQ. The Metabolites of a mangrove endopathytic fungus, penicillium thomi. J. Asian Natural Product Research. Vol 9. 159-164.
9. Homhual S, Zhang HJ, Bunyapraphatsara. N, Kon-

- dratyuk TP, Santar Siero BD, Mesear AD, Herunsalee A, Chaukul W, Pezzuto JM, Fong HH. Brugiesulfurool, a new compound from *Bruguiera gymnorhiza*, *Planta med*, Departement of Pharmacognosy Bangkok; Faculty of Pharmacy Mahidol University Thailand; 2006.
10. McGahon Aj, Martin SJ, Bissonnete RP, Mahboubi M, Shi Y, Mogil R J, Nishioka WK, Green DR. The End of The (Cell) Line; Methode for the Study of Apoptosis in Vitro, in Schwartz, L.M, Osbome BA. Cell Death, Methods in cell Biology Vol 46, San Diego: Academic Press; 1995
 11. Spector D. Cells, A Laboratory manual, subselluler localization of genes and their product, volume 3, Cold Spring Harbor. USA: Labolatory Press; 1998.
 12. Warsinah Puji L., Trisnowati. Isolasi Terpenoid pada tananam *B. gymnorhiza* Sebagai Bahan Antikanker. Laporan Penelitian Dasar; 2005.
 13. Warsinah, Hartiwi Diastuti, Suwandri. Isolasi Senyawa Bioaktif pada Kulit Batang *B. gymnorhiza* Sebagai Bahan Antikanker. Laporan Penelitian Hibah bersaing; 2007.
 14. Wyllie A, Donahue V, Fisher B, Hill D, Keeseey J, Manzow S. Cell Death Apoptosis and Necrosis. Rosche Diagnosis Cooperation. 2000. 2-64
 15. Cassady JM, Baird W, and Chang CJ. Natural products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and chemopreventive Agents. *Journal of Natural products*. 1990. 53(1) 34.
 16. Miao ZH, Qing Chen, Tong ian Jiang, Zhang Jin, Sheng Dig Jian. Cytotoxic, apoptosis induction and down regulation of MDR1 expression by antitopoisomerase II agent, salvicine, in multidrug resistant tumor cells. *Int J cancer*. 2003. 160(1). 180-15
 17. Beck Wt, Mo YY, Bhat UG. Cytotoxic Signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II, *Biochemical Society*. 2001. 29 (6). 702-703
 18. Sukardiman, Rahman A, Ekasari W, dan Sismin-dari. Induksi Apoptosis Senyawa *Andrographolida* dari *Sambiloto* (*Andrographis paniculata*) terhadap kultur sel kanker. *Media Kedokteran Hewan*. 2005. 1 (3). 105-110