

Isolasi senyawa antikanker dari akar berambut *Artemisia cina* dan aktifitas inhibisinya terhadap sel kanker mulut rahim

Isolation of anticancer compound of *Artemisia cina* hairy root and its inhibition activity on cervix cancer cells.

Aryanti ¹⁾, Tri Muji Ermayanti ²⁾, Ika Mariska ³⁾ dan Maria Bintang ⁴⁾

¹⁾ Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi,

²⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI

³⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan

⁴⁾ Institut Pertanian Bogor

Abstrak

Penderita kanker di Indonesia semakin meningkat, sehingga kebutuhan obat semakin meningkat. Pengobatan dengan cara radioterapi dan kemoterapi memerlukan biaya yang cukup tinggi. Pengobatan kanker dengan tanaman merupakan cara yang sangat murah bagi penduduk Indonesia yang kaya dengan tanaman obat. Untuk itu diperlukan penelitian isolasi dan pengujian senyawa yang berpotensi antikanker pada akar berambut *Artemisia cina*.

Telah dilakukan penelitian isolasi senyawa antikanker dari akar rambut *Artemisia cina* serta uji aktivitas terhadap sel kanker mulut rahim. Akar rambut hasil transformasi dengan *Agrobacterium rhizogenes* galur A4 dan ATCC-15834 diekstrak dengan n-heksan kemudian dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dengan pelarut n-heksan/etil asetat bervariasi. Semua sample baik ekstrak n-heksan maupun hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan uji hayati terhadap sel kanker mulut rahim HeLa Ohio dengan konsentrasi zat uji 50 µg/ml untuk ekstrak n-heksan, 10 µg/ml untuk kromatografi kolom. Fraksi teraktif diuji lanjut dengan konsentrasi 1 sampai 5 µg/ml konfirmasi akar transformasi pada *A.cina* dilakukan dengan analisis PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan dari akar berambut maupun akar normal (*in vitro*), daun dari tanaman rumah kaca sebagai kontrol memberikan nilai inhibisi sekitar 84 %. Hasil uji hayati pemisahan kromatografi kolom menunjukkan bahwa fraksi E merupakan fraksi teraktif dengan nilai inhibisi 95 % dan IC₅₀ dari fraksi ini pada konsentrasi 1 µg/ml, identifikasi senyawa pada fraksi ini yaitu golongan terpenoid. Hasil konfirmasi dengan PCR yaitu terjadi transfer TL-DNA dengan ukuran 780 kb.

Kata kunci : antikanker, akar berambut, *Artemisia cina*.

Abstract

The research of isolation of anticancer agent of *A.cina* hairy roots and its inhibition activity on cervix cancer cells have been conducted. Hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strains A4 and ATCC-15834 were then extracted by n-hexane and separated by column chromatography with variation of n-hexane/ethyl acetate as eluent. All samples include hexane extract and result of column chromatography tested to cervix HeLa Ohio cells with concentration of 50 µg/ml for hexane extract and 10 µg/ml for column chromatography respectively. The most active fraction was then tested by the concentration of 1 to 5 µg/ml. Confirmation of transformed root of *A.cina* was conducted by PCR analysis. The result of experiment

shown that hexane extract of hairy root, normal root (*in vitro*), leaves of plant from green house as a control gave the inhibition value were about 84 %. The most active fraction from column chromatography was fraction E with IC₅₀ at the concentration of 1 µg/ml and inhibition value was 95 %, the identification compound of this fraction was terpenoid group. The confirmation result showed that TL-DNA was transferred by 780 kb.

Key words : anticancer, hairy root, *Artemisia cina*.

Pendahuluan

Indonesia merupakan Negara tropis yang kaya dengan berbagai tumbuhan. Sekitar 30.000 spesies tumbuhan berguna terdapat di sini. Tumbuhan tersebut sebagian telah dimanfaatkan masyarakat sebagai sumber pangan maupun obat-obatan.

Penggunaan tumbuhan sebagai obat di Indonesia telah berlangsung sejak lama dan masyarakat menggunakannya secara turun temurun berdasarkan pengalaman, masih terbatas tradisional dan belum banyak diketahui kandungan senyawa dan manfaat lainnya, hanya beberapa spesies yang telah diketahui kandungannya dari 1260 spesies tanaman obat yang ada di Indonesia.

Tanaman pule pandak (*Rauwolfia serpentina*) mengandung alkaloid reserpina, ajmalina dan ajmalisina berkhasiat sebagai antihipertensi, dan melancarkan sirkulasi darah otak. Ciplukan (*Physalis minima*) telah diketahui mengandung senyawa pisin yang aktif sebagai antikanker, demikian juga tanaman tapak dara

(*Catharanthus roseus*) mengandung senyawa vinkristina dan vinblastina yang telah dijual secara komersial sebagai antikanker (dePadua, 1999). Senyawa-senyawa selain alkaloid seperti flavonoid, steroid, dan terpenoid juga dapat berfungsi sebagai antikanker.

Senyawa terpenoid dari tanaman *Euphorbia* aktif terhadap sel kanker, senyawa kurkumol dan kardion dari *Curcuma zedoaria* (Syu *et.al* 1998) menghambat pertumbuhan sel sarkoma 37 dan kanker mulut rahim, demikian juga senyawa artemisinin dari *Artemisia annua* berpotensi sebagai antikanker (Zheng, 1994). Senyawa ini juga telah diekstrak dari akar berambut pada tanaman yang sama (Weathers *et.al* 1994) dan senyawa vinkristin dan vinblastin yang bersifat antikanker juga telah diekstrak dari akar rambut tapak dara (*Catharanthus roseus*), namun penelitian isolasi senyawa antikanker mulut rahim dari akar berambut hasil transformasi genetik dengan *Agrobacterium*

rhizogenes dari tanaman *A.cina* belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa antikanker dari akar berambut *Artemisia cina* serta aktivitasnya terhadap sel kanker mulut rahim HeLa Ohio.

Metodologi

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar berambut *Artemisia cina* hasil transformasi genetik dengan bakteri *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 dan ATCC-15834, daun dari tanaman rumah kaca dan akar normal (*in vitro*) sebagai kontrol.

Kultur akar berambut

Akar berambut diperoleh dari hasil inokulasi bagian daun dan batang *A.cina* dengan bakteri *A.rhizogenes* galur A4 dan ATCC-15834 dan dikultur pada media Murashige & Skoog tanpa fitohormon. Akar hasil transformasi sebagian dianalisis DNA dengan PCR dan sebagian dikeringkan untuk isolasi senyawa antikanker.

Analisis PCR

Ekstraksi DNA akar berambut, akar normal, tanaman rumah kaca dan bakteri dilakukan menurut metode Sambrook *et.al* (1989) dan analisis PCR menurut metode Hamill *et.al* (1991). Primer yang digunakan yaitu *rolB1* (5' ATGGATCCCCAAA TTGC-TATTCCCCCAGCA 3') dan *rolB2* (5' TTA GGCTTCCTTCATTCGGGT-CTGCAGC3'). Reaksi PCR dilakukan dengan alat gene Amp PCR system 2400, reaksi berlangsung pada suhu 92 °C selama 1 menit untuk denaturasi untai ganda DNA, dilanjutkan 1 menit pada suhu 55 °C untuk *annealing*, reaksi berlangsung sampai 25 siklus reaksi.

Ekstraksi dan isolasi senyawa anti kanker

Akar berambut, tanaman kontrol yang telah kering diekstrak dengan n-heksan sehingga diperoleh ekstrak pekat seberat 500 mg. Kemudian dilakukan kromatografi kolom dengan eluen n-heksan/etilasetat perbandingan 2 hingga 100 % dengan metode ElSohly dimodifikasi (1989). Hasil kromatografi kolom merupakan fraksi-fraksi selanjutnya dilakukan uji golongan senyawa dan uji

aktivitas terhadap sel kanker mulut rahim HeLa Ohio.

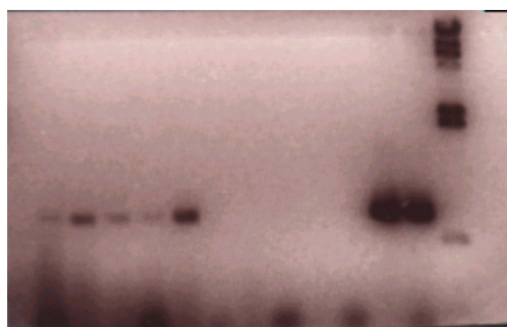
Uji inhibisi sel kanker mulut rahim

Sel kanker mulut rahim HeLa Ohio dikulturkan pada medium RPMI 1640 dalam buffer *hepes* dan *calf serum* dan dihitung jumlah awal sel di bawah mikroskop. Sebanyak 10 µl masing-masing zat uji dengan kadar 50 µg/ml untuk ekstrak kasar dan 10 µg/ml untuk fraksi hasil kolom kromatografi, kemudian 1 ml suspensi sel kanker dimasukkan ke dalam *multi-well plate tissue culture* kemudian diinkubasi pada incubator CO₂ selama 72 jam dan dihitung jumlah sel yang hidup. Sebagai pembandingan digunakan kontrol yaitu dimasukkan sebanyak 10 µl eluen ke dalam suspensi sel. Uji inhibisi dilanjutkan pada konsentrasi yang lebih kecil, yaitu 1,3 dan 5 µg/ml pada fraksi yang memberikan persen kematian paling tinggi.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil analisis PCR untuk konfirmasi DNA yang terintegrasi pada akar (Gambar 1)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Gambar 1. Hasil konfirmasi transfer DNA dengan PCR

Keterangan Gambar :

- No. 1 - 3 : akar hasil transformasi dengan galur A4
- No. 4 - 5 : akar hasil transformasi dengan galur ATCC- 15834
- No. 6 - 10 : akar normal, daun rumahkaca dan tanaman rumah kaca
- No.11-12 : bakteri *Agrobacterium rhizogenes* A4 dan ATCC-15834
- No. 13 : marker λ *HindIII*

Pada Gambar 1 terlihat bahwa adanya integrasi dari bagian kiri TL-DNA yang memberikan ukuran 780 kb, yaitu ukuran yang

sama dengan ukuran basa yang ada pada bakteri *A.rhizogenes* ATCC-15834 dan A4. Bakteri ini merupakan bakteri tanah gram negatif yang dapat menyebabkan timbulnya akar berambut pada bagian tanaman yang terinfeksi, dan akan mentransfer T-DNA yang terdapat pada plasmid Ri (*root inducing*) (Altman, 1998). Daerah TL-DNA sangat penting untuk menginduksi akar rambut, karena adanya gen *root locus* B yang menginduksi akar. Sehingga dengan terbentuknya akar berambut dan munculnya pita ukuran 780 kb membuktikan telah terjadinya transfer TL-DNA pada *A.cina*.

Hasil uji inhibisi ekstrak kasar dari tanaman rumah kaca, akar normal dan akar berambut terhadap sel kanker mulut rahim HeLa Ohio (Tabel I). Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak kasar dengan konsentrasi 50 µg/ml dapat menghambat pertumbuhan sel kanker mulut rahim sebanyak 88,89 %. Ekstrak kasar mengandung senyawa bioaktif karena dapat menghambat pertumbuhan sel kanker mulut rahim sebesar 50 % pada konsentrasi 50 µg/ml, sehingga ekstrak kasar ini dapat dilanjutkan untuk dipisahkan secara kromatografi kolom.

Tabel I. Nilai IC₅₀ ekstrak kasar dari akar berambut dan kontrol pada konsentrasi 50 mg/l terhadap sel kanker HeLa Ohio

Ekstrak kasar	IC ₅₀ (µg/ml)
Tanaman rumah kaca	29,60
Akar normal (<i>in vitro</i>)	29,60
Akar berambut dari galur A4	28,12
Akar berambut dari galur ATCC-15834	29,60

Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut n-heksan/etil asetat bervariasi menghasilkan 5 fraksi gabungan dan memberikan hasil positif senyawa terpenoid dengan vanillin dan cerium sulfat. Lima fraksi tersebut, yaitu A, B, C, D dan E dan diuji lanjut aktivitasnya terhadap sel kanker mulut rahim HeLa Ohio pada konsentrasi 10 µg/ml (Tabel II).

Hasil uji inhibisi sel kanker mulut rahim HeLa Ohio oleh masing-masing fraksi memperlihatkan bahwa fraksi E mempunyai aktivitas yang tertinggi dari empat fraksi lainnya. Menurut Tan *et.al* (1998) senyawa aktif antitumor dari tanaman *Artemisia sp.*

Tabel II. Persentase inhibisi sel kanker mulut rahim HeLa Ohio oleh fraksi A, B, C, D dan E pada konsentrasi 10 µg/ml

Fraksi	Tanaman Rumahkaca	Akar normal	Akar berambut A4	Akar berambut ATCC 15834
A	33,33f	35,55f	35,55f	33,33f
B	57,77e	58,55e	57,77e	55,55e
C	71,11d	68,89d	73,33d	71,11d
D	82,22c	82,22c	82,22c	84,45c
E	95,55a	93,32a	95,55a	97,77a

Keterangan : Huruf yang tidak sama pada masing-masing kolom menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada taraf 5 % menurut uji faktorial.

Tabel III. Persentase inhibisi sel kanker mulut rahim HeLa Ohio oleh fraksi E pada beberapa konsentrasi

Konsentrasi (µg/ml)	Tanaman rumah kaca	Akar normal	Akar berambut A4	Akar berambut ATCC 15834
1	55,98c	55,13c	56,14c	55,13c
3	65,38b	65,38b	65,38b	64,10b
5	76,92a	76,98a	78,20a	76,92a

Keterangan : Huruf yang tidak sama pada masing-masing kolom menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada taraf 5 % menurut uji faktorial.

adalah berupa mono dan sesquiterpen. Dengan nilai inhibisi yang tinggi oleh fraksi E dan adanya spot berwarna coklat dengan cerium sulfat pada plat kromatografi lapis tipis serta warna hijau dengan vanillin, maka dapat diasumsikan bahwa senyawa yang aktif tersebut adalah terpenoid. Oleh karena fraksi E menghambat pertumbuhan sel hingga 97,77 %, maka fraksi ini diuji lanjut dengan konsentrasi lebih kecil dari 10 µg/ml (Tabel III).

Zheng (1994) telah melakukan uji sitotoksitas dari *Artemisia annua* terhadap *Plasmodium falciparum* secara *in vitro* dan beberapa jenis sel kanker, ternyata ekstrak tanaman ini berupa senyawa sesquiterpen memberikan hasil yang sangat nyata menghambat pertumbuhan kedua jenis sel uji tersebut. Dari beberapa senyawa sesquiterpen yang diperoleh senyawa artemisinin merupakan teraktif terhadap sel

leukemia P-388, yaitu IC₅₀ pada konsentrasi 0,0962 µg/ml, sedang senyawa lain seperti artenuin B, asam artemisinat dan friedelin menghambat pertumbuhan sel pada konsentrasi besar dari 10 µg/ml baik terhadap sel leukemia P-388 maupun karsinoma paru-paru A-549, adenokarsinoma usus HT-29, adenokarsinoma mammae MCF-7 dan karsinoma kerongkongan KB.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terdapat pada akar berambut *A.cina* hasil transformasi dengan *A.rhizogenes* A4 dan ATCC-15834 maupun kontrol adalah terpenoid yang aktif terhadap sel kanker HeLa Ohio dengan nilai IC₅₀ konsentrasi 1 µg/ml dan ukuran TL-DNA yang ditransfer oleh kedua bakteri, yaitu 780 kb.

Daftar Pustaka

- Altman, A. 1998. *Agricultural Biotechnology*. Marcel Dekker Inc, New York.
- DePadua, L.S., N. Bunyapraphatsara and R.H.M.J. Lemmens. 199. *Plants Resources of South-East Asia*, Bogor, Indonesia.
- ElSohly, H.N., A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. 1990. *J.of Natural Products* 6 : 1560 -1564.

- Hamill, J.D., S. Rounsley, A. Spencer, B. Todd and M.J.C. Rhodes. 1991. The use of the PCR to detect specific sequence in transformed plant tissue, in : Nijkam, H.J.J., Plas L.H.W. and Aartijk J.V. (Eds.). *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, London. 161.
- Sambrook, J.E., T. Frits, and Maniatis. 1998. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual, New York.
- Syu, W.Jr., C.C. Shen, M.S. Don J.C. Ou, G.H. Lee & C.M. Sun. 1998. Cytotoxic of curcuminoids and some novel compound from *Curcuma zedoaria*. *J. of Natural Products* 61 : 1531 – 1534.
- Tan, R.X., W.F. Zheng, and H.Q. Tang. 1998. Biological active substances from genus *Artemisia*. *Planta Medica*. 64 : 1531 – 1534.
- Weather, J., R.P. Cheetham, E. Follansbee and K. Teoh. 1994. Artemisinin production of transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnology Letters*, 12 1281 – 1286.
- Zheng, G.Q. 1994. Cytotoxic terpenoid and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica* 60: 54– 57.