

## Pemacuan Apoptosis oleh Fraksi Kloroform Kulit Batang *Bruguiera gymnorhiza* pada Sel Kanker Rahim HeLa

### (Apoptotic Induction by Chloroform Fraction from Stem Bark of *Bruguiera gymnorhiza* to the Cervix Cancer on HeLa Cells)

WARSINAH<sup>1\*</sup>, SISMINDARI<sup>2</sup>, AND RATNA ASMAH SUSIDARTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Unsoed Purwokerto  
Jl. Dr. Soeparno, Karangwangkal, Purwokerto 53123.

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta.

Diterima 17 Januari 2012, Disetujui 26 Agustus 2012

**Abstrak:** *Bruguiera gymnorhiza* merupakan salah satu tanaman mangrove yang belum banyak diteliti potensinya sebagai antikanker. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* bersifat sitotoksik terhadap sel kanker HeLa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik dan pemacuan apoptosis fraksi kloroform dari kulit batang *B. gymnorhiza* pada sel kanker HeLa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi kloroform mempunyai aktivitas sitotoksik dengan  $IC_{50}$  sebesar 134  $\mu\text{g/mL}$  dan hasil uji *double staining* menunjukkan adanya sel yang mengalami apoptosis. Berdasarkan hasil tersebut, fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* bersifat sitotoksik dengan mekanisme apoptosis.

**Kata kunci:** apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, sel HeLa, sitotoksik, fraksi kloroform.

**Abstract:** *Bruguiera gymnorhiza* is one of the mangrove plant that has not been widely studied as a potential anticancer. Previous research has suggested that the methanol extract of stem bark of *B. gymnorhiza* was cytotoxic against HeLa cells. The purpose of this study was to determine the cytotoxic effect and apoptosis induction of chloroform fraction from the stem bark of *B. gymnorhiza* on HeLa cells. The results showed that the chloroform fraction has a cytotoxic activity with  $IC_{50}$  of 134  $\mu\text{g/mL}$  and the double staining test indicated the presence of cells undergoing apoptosis. Based on these results, chloroform fraction of stem bark of *B. gymnorhiza* is cytotoxic with the mechanism of apoptosis.

**Keywords:** apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, HeLa cells, cytotoxic, chloroform fraction.

#### PENDAHULUAN

SEL tumor (kanker) merupakan sel yang tumbuh otonom, liar, tidak terkendali dan lepas kontrol dari koordinasi pertumbuhan normal sehingga mengalami perubahan (transformasi) bentuk, sifat dan kinetiknya. Transformasi sel terjadi karena mutasi gen pengatur pertumbuhan dan diferensiasi proto-oncogen atau supresor gen<sup>(1)</sup>. Kanker merupakan salah satu ancaman utama di bidang kesehatan di dunia. Kematian akibat penyakit kanker tersebut menduduki peringkat ke-2 setelah penyakit kardiovaskuler<sup>(2)</sup>, dan di Indonesia mencapai 4,3% atau menduduki

peringkat ke-6<sup>(3)</sup>. Berbagai usaha dilakukan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kanker, salah satu usaha yang sedang intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antitumor dari bahan alam<sup>(4)</sup>.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa bahan-bahan dari tanaman ternyata mempunyai potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen supresor tumor, sehingga berpotensi sebagai antikanker<sup>(5)</sup>. *Bruguiera gymnorhiza* merupakan salah satu tumbuhan mangrove yang hidup di pantai, dapat dijadikan sumber senyawa bioaktif seperti golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktifitas anti mikroba, antifungi, antivirus, antitumor, insektisida dan antileukemia<sup>(6)</sup>. Pemanfaatan tanaman

\* Penulis korespondensi, Hp. 085643243750  
e-mail: warsinah@rocketmail.com

*B. gymnorrhiza* sebagai obat tradisional digunakan oleh masyarakat dalam terapi penyakit gastroenteritis dan anti kanker<sup>(7)</sup>. Hasil isolasi jamur endofit *Penicillium thomi* yang terdapat pada akar *B. gymnorrhiza* diperoleh senyawa 4',5-dihidroksi-2,3-dimetoksi-4-(hidroksipropil)-biphenil<sup>(8)</sup> yang bersifat sitotoksik terhadap tiga jenis sel kanker yaitu A549, HepG2 dan HT29 secara *in vitro*, sedangkan dari bunga *B. gymnorrhiza* ditemukan senyawa 4-hidroksi-dithio-sulfonat (bruguisulfurol), hidroksidithiolan 1-oxida (bruguirol) dan isobruguirol dengan aktifitas antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  masing-masing adalah 56,7  $\mu$ M, 3,7  $\mu$ M dan 1,8  $\mu$ M. Senyawa bruguirol dan isobruguirol mampu menghambat phorbolster-induksi NF- $\kappa$ B dengan  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 85 dan 14,5  $\mu$ M, sedangkan bruguirol juga mampu menghambat enzim COX-2 dengan  $IC_{50}$  sebesar 6,1  $\mu$ M<sup>(9)</sup>. Ekstrak etanol 70% kulit batang *B. gymnorrhiza* juga menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 301,78  $\mu$ g/mL dan menghambat sel Myeloma dengan  $IC_{50}$  sebesar 582  $\mu$ g/mL secara *in vitro*<sup>(10)</sup>. Senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorrhiza* adalah golongan terpenoid. Ekstrak metanol juga mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan  $IC_{50}$  sebesar 228,8  $\mu$ g/mL<sup>(11)</sup>. Senyawa antitumor yang baik adalah senyawa yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis, sehingga pencarian senyawa dari bahan alam umumnya ditekankan pada senyawa aktif yang bersifat antiproliferatif, sitotoksik, antimetabolik dan apoptosis terhadap sel kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dan pemacu apoptosis fraksi kloroform dari kulit batang *Bruguiera gymnorrhiza* pada sel kanker HeLa.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Tanaman *B. gymnorrhiza*, kultur sel HeLa, media 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), stopper reagent (natrium dodesil sulfat) (Merck) 10% dalam HCl, MTT 5 mg/mL dalam FBS, metanol, etil asetat, kloroform, *n*-heksan.

Alat. Autoklaf, ELISA reader, neraca analitik, sentrifus, inkubator CO<sub>2</sub>, laminar air flow, tangki nitrogen cair, hemositometer, vortex, mikroskop inverted, mikroskop fluoresensi, mikroskop cahaya, mikropipet, kamera digital, rotavapor.

**METODE. Ekstraksi dan Fraksinasi.** Kulit batang *B. gymnorrhiza* diambil dari wanawisata Tritih Cilacap, dipotong kecil-kecil, dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutupi kain hitam kemudian diserbuk. Selanjutnya serbuk tersebut ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian di maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol. Ekstrak disaring, filtrat kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak tersebut kemudian difraksinasi secara partisi dengan *n*-heksan dan kloroform. Kedua fraksi tersebut diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh fraksi kental bebas pelarut, selanjutnya fraksi kloroform diuji aktivitasnya.

**Pembuatan larutan uji.** Fraksi kloroform ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 1 mL DMSO (1,25%) dalam aquades steril, larutan tersebut disaring dengan filter 0,2  $\mu$ m sehingga diperoleh larutan stok 10 mg/mL dan dimasukkan dalam conical steril, ditutup dengan parafilm, kemudian dibuat seri kadar sampel dari larutan stok dalam media RPMI 1640 masing-masing dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25  $\mu$ g/mL. Pembuatan larutan uji dilakukan di dalam laminar air flow cabinet secara aseptis.

**Uji sitotoksik dengan metode MTT.** Seratus mikroliter suspensi sel HeLa dengan kepadatan 2 x 10<sup>4</sup>/100  $\mu$ L didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C kemudian ditambah larutan uji dengan kadar masing-masing 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25  $\mu$ g/mL. Sebagai kontrol digunakan 100  $\mu$ L suspensi sel ditambah media. Selanjutnya dilakukan inkubasi lagi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi setiap sumuran yang berisi sel kontrol maupun sel uji ditambahkan 10  $\mu$ L MTT 5 mg/mL dalam medium RPMI. Kemudian diinkubasi lagi selama 4 jam. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan stopper reagent, kemudian diinkubasi semalam pada suhu kamar. Sel uji yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu, serapan (absorbansi) dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

**Uji induksi apoptosis.** Uji induksi apoptosis dilakukan menggunakan well plate dengan 24 sumuran yang diberi coverslips. Lima ratus mikroliter sel dengan kepadatan 2 x 10<sup>4</sup> sel/sumuran ditanam dalam sumuran, didiamkan selama 15 menit agar sel dapat menempel pada coverslips kemudian ditambah 500  $\mu$ L media kultur. Sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C. Medium dibuang dan diganti dengan 500  $\mu$ L senyawa uji dengan konsentrasi 1/2  $IC_{50}$ , kemudian diinkubasi lagi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C selama 24 jam sampai 50% konfluen. Media dibuang, coverslips diangkat dan ditaruh diatas gelas objek dan dicuci dengan PBS, lalu ditambahkan

10  $\mu\text{L}$  campuran etidium bromida–akridin oranye. Setelah didiamkan selama 5 menit sel segera diamati dibawah mikroskop flouresensi. Sel hidup akan berflouresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati akan berflouresensi merah (dengan etidium bromida).

**Analisis data.** Data sitotoksik dari hasil pembacaan absorbansi ELISA reader dikonversikan dalam bentuk % sel hidup dengan cara sebagai berikut:

% sel hidup =

$$\frac{\text{Abs sel perlakuan} - \text{Abs media}}{\text{Abs sel kontrol} - \text{Abs media}} \times 100\%$$

Abs sel kontrol - Abs media

Potensi aktivitas sitotoksik direpresentasikan sebagai harga  $\text{IC}_{50}$  yang dihitung menggunakan metode probit<sup>(12)</sup>, semakin kecil harga  $\text{IC}_{50}$  maka potensi sitotoksiknya semakin besar. Harga tersebut merupakan nilai konsentrasi yang menghasilkan kematian 50% sel. Perhitungan harga  $\text{IC}_{50}$  berdasarkan hubungan regresi linier antara kadar fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* vs % hidup. Semua data disajikan dalam bentuk mean  $\pm$  SD, analisis statistik menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

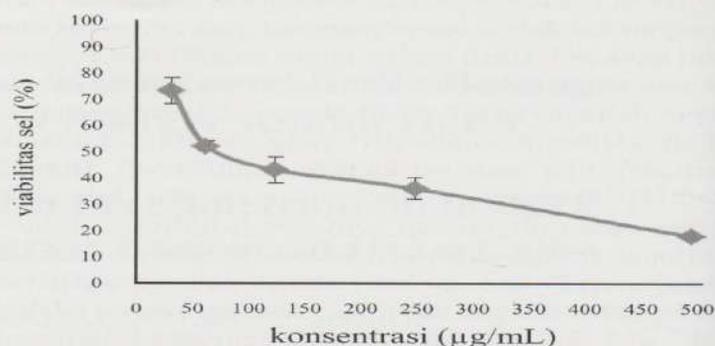
Analisis adanya apoptosis pada metode *double staining* didasarkan pada pengamatan warna flouresen yang dihasilkan oleh sel. Flouresensi hijau menunjukkan sel masih hidup sedangkan flouresensi oranye menunjukkan sel mati apoptosis. Data yang didapat dianalisis secara kualitatif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi dengan pelarut metanol diperoleh ekstrak kental berwarna coklat sebesar 13,07%. Ekstrak kental metanol yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan dan kloroform menunjukkan bahwa fraksi yang tersari dalam pelarut *n*-heksan jumlahnya sangat sedikit (< 0,00%) dan fraksi yang terlarut dalam kloroform jumlahnya lebih banyak (0,08%) sehingga dalam pengujian selanjutnya hanya fraksi kloroform yang diuji aktivitasnya.

Aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa. Hasil uji sitotoksik fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* pada kultur sel HeLa setelah diinkubasi selama 24 jam menunjukkan adanya fenomena *dose dependent* yaitu semakin besar konsentrasi senyawa uji semakin banyak sel yang mati (Gambar 1). Dari kurva tersebut dibuat persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier yang didapat adalah  $y = -0,0915x + 61,588$  dengan  $R^2 = 0,9632$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  dihitung secara intrapolasi menggunakan rumus tersebut sehingga diperoleh angka 134  $\mu\text{g/mL}$ .

Pada pengamatan morfologi sel HeLa kontrol terlihat bahwa sel melekat di dasar sumuran dengan

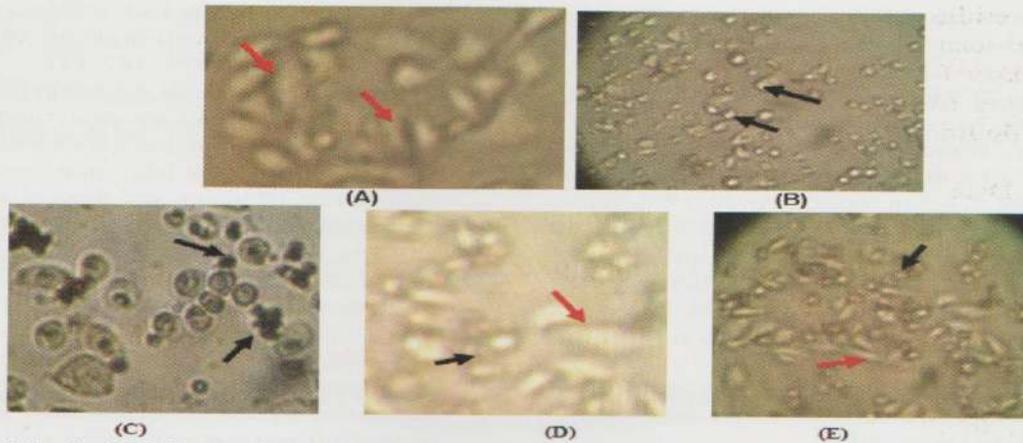


**Gambar 1.** Kurva % sel HeLa hidup vs kadar fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza*. Kadar fraksi yang digunakan 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 31,25  $\mu\text{g/mL}$ .

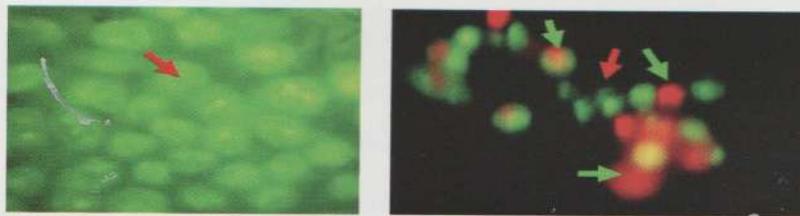
bentuk helaian daun. Perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* menyebabkan terjadinya perubahan morfologi sel HeLa. Sel yang mati berbentuk bulat, mengapung dan tampak keruh (Gambar 2).

**Uji Induksi Apoptosis.** Hasil uji induksi apoptosis dengan pengecatan DNA menggunakan metode *double staining* memperlihatkan warna hijau terang pada kontrol sel (Gambar 3). Sel hidup yang masih mempunyai membran yang utuh, nukleusnya akan berwarna hijau terang<sup>(13,14)</sup>, sedangkan pada sel dengan perlakuan fraksi kloroform (134  $\mu\text{g/mL}$ ) memperlihatkan warna yang tidak sama yaitu warna hijau bercampur oranye yang mengindikasikan terjadinya apoptosis. Adanya fragmentasi DNA sel kanker dengan pewarnaan etidium bromida menyebabkan terjadinya interkultasi antara DNA dengan zat warna etidium bromida sehingga sel mengalami apoptosis<sup>(15)</sup>.

Potensi fraksi kloroform dalam memacu apoptosis sel kemungkinan karena adanya senyawa terpenoid. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu<sup>(10)</sup>, bahwa di dalam ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* mengandung senyawa terpenoid. Diterpen dilakton yang merupakan senyawa terpenoid dari tanaman *Avicinea apiculata* mampu menghambat pertumbuhan sel tumor paru (A-549) secara *in vitro*<sup>(16)</sup>. Senyawa diterpenoid kuinon dari tanaman *Salvacina* sp. memiliki aktivitas inhibitor pada enzim topoisomerase II dan mempunyai efek induksi apoptosis terhadap sel leukemia<sup>(17)</sup>. Penelitian ini dilakukan menggunakan isolasi DNA total dan fragmentasi DNA diamati dengan metode elektroforesis. Topoisomerase merupakan enzim yang bekerja pada proses replikasi dengan kemampuan memotong DNA yang berlipitan akibat pembukaan *double strand* DNA oleh enzim



Gambar 2. Morfologi sel HeLa setelah inkubasi 24 jam. Sel kontrol (A), sel dengan perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* konsentrasi 500 µg/mL (B), 250 µg/mL (C), 125 µg/mL (D), dan 62,5 µg/mL (E). Sel hidup (→) melekat didasar sumuran berbentuk helaian daun, dan sel mati (→) berbentuk bulat, mengapung dan keruh. Pada perlakuan fraksi kloroform banyak ditemukan sel mati.



Gambar 3. Morfologi sel HeLa dengan pengecatan DNA menggunakan metode *double staining* (akridin oranye – etidium bromida), pengamatan dilakukan dibawah mikroskop fluoresens. (A) Sel kontrol berwarna hijau terang (→) yang menandakan bahwa sel masih hidup, (B) perlakuan fraksi kloroform, sel Hela terlihat berwarna oranye dengan bentuk yang tidak teratur (→) yang mengindikasikan sel mengalami apoptosis.

helikase, memutar balik dan selanjutnya menyambung lagi. Apabila aktivitas topoisomerase dihambat maka stabilitas kompleks topoisomerase-DNA terpotong sehingga menimbulkan kerusakan permanen pada *double strand DNA*<sup>(18)</sup>. 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<sup>(19)</sup>.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme apoptosis dengan harga  $IC_{50}$  sebesar 134 µg/mL. Selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas terhadap ekspresi gen yang bertanggungjawab pada proses apoptosis sel kanker HeLa secara *in vitro*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M Ditjen DIKTI Kemendiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program penelitian Hibah Bersaing.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Sukardja IDG. Onkologi klinik. Ed II. Surabaya: Airlangga University Press; 2000. 234-9.
2. Anonim. Health information for world. World Health Organisation. 2005. diambil dari <http://diahome.org/content/abstract/2005/dij991>. diakses 5 Mei, 2007.
3. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, Present and future. *Jpn J Clin Oncol*. 2002.32 (Supplement 1):S17-S21.
4. Ma'at S. Obat tradisional untuk pelayanan kesehatan formal. Prosiding Seminar Nasional. Surabaya 5 September, 2004:45-9.
5. Cardenas ME, Sanfridson A, Cuter NS, Heitman J. Signal transduction cascade as targets for therapeutics intervention by natural products. *Tibtech*. 1998. 427-33.

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, 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 endoparasitic fungus *Penicillium thomi*. *J. Asian Natural Product Research*, 2007.9:159-64.
9. Homhual S, Zhang HJ, Bunyapraphatsara N, Kondratyuk TP, SantarSiero BD, Mesear AD, Herunsalee A, Chaukul W, Pezzuto JM, Fong H. Brugiesulfurol, a new compound from *Bruguiera gymnorhiza*. *Planta med*. 2006.3:104-9.
10. Warsinah, Puji L, Trisnowati. Isolasi terpenoid pada tanaman *B. gymnorhiza* sebagai bahan antikanker. Laporan Penelitian Dasar. 2005.
11. Warsinah, Hartiwi D, Suwandri. Isolasi senyawa bioaktif pada kulit batang *B. gymnorhiza* sebagai bahan antikanker. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. 2007.
12. Cutler SJ, Cutler H. *Biologically active natural products: Pharmaceuticals*. Boca Raton: CRC Press LLC; 2000. 1-13, 17-22, 73-92.
13. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnete RP, Mahboubi M, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line; Method for the study of apoptosis *in vitro*. In: Schwartz LM, Osbome BA, editors. *Cell death, methods in cell biology*. Vol 46. San Diego: Academic Press; 1995. 142-151.
14. Wyllie A, Donahue V, Fisher B, Hill D, Keesey J, Manzow S. *Cell death apoptosis and necrosis*. Rosche Diagnosis Corporation; 2000. 2-64.
15. Spector D. *Cells, A laboratory manual, subcellular localization of genes and their product*. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998.
16. Cassady JM, Baird W, Chang CJ. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural products*. 1990.53(1):34-39.
17. Miao ZH, Chen Q, Jiang TI, Jin Z, Jian SD. Cytotoxic, apoptosis induction and down regulation of MDR1 expression by anti-topoisomerase II agent, Salvicine, in multidrug-resistant tumor cells. *Int. J. Cancer*. 2003.160(1):180-5.
18. Beck WT, Mo YY, Bhat UG. Cytotoxic signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II. *Biochemical Society*. 2001.29(6):702-3.
19. Sukardiman, Rahman A, Ekasari W, Sismindari. Induksi apoptosis senyawa *Andrographolida* dari *Sambiloto (Andrographis paniculata)* terhadap kultur sel kanker. *Media Kedokteran Hewan*. 2005.1(3). 105-10.