

**EFEK SITOTOKSIK FRAKSI SEMIPOLAR EKSTRAK METANOLIK KULIT
BATANG CANGKRING (*Erythrina fusca* Lour) TERHADAP SEL HeLa**

**CYTOTOXIC EFFECT of SEMIPOLAR FRACTION of METHANOLIC EXTRACT of
THE BARK of *Erythrina fusca* Lour on HeLa CELLS**

Edy Meiyanto *, **Fitria Rahmi**, **Sugeng Riyanto**
Fakultas Farmasi Universitas gadjah Mada

ABSTRAK

Pada penelitian terdahulu menyebutkan bahwa ekstrak etanolik kulit batang cangkring (*Erythrina fusca* Lour) mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan IC_{50} sebesar 11 $\mu\text{g/ml}$. Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas sitotoksik fraksi ekstrak metanol kulit batang tumbuhan Cangkring (*E. fusca* Lour) serta mempelajari mekanismenya dalam penghambat pertumbuhan sel HeLa.

Fraksi uji diperoleh dari kolom kromatografi terhadap ekstrak metanolik hasil maserasi bertingkat sesuai gradien kepolaran terhadap kulit batang *E.fusca*. Fraksi-fraksi yang didapat dikelompokkan berdasarkan persamaan profil KLT dan diperoleh sebanyak 10 fraksi (A-J). Selanjutnya Fraksi F, G dan I dilakukan uji sitotoksik terhadap sel HeLa dengan metode MTT. Fraksi yang paling poten selanjutnya diuji efek penghambatan proliferasi dengan metode *direct counting* untuk menghitung *doubling time*, dan efek apoptosis dengan pengecatan *acrydine orange*.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi F memiliki potensi yang paling tinggi dengan IC_{50} 76 $\mu\text{g/ml}$. Uji *doubling time* menunjukkan bahwa pada kadar 25 $\mu\text{g/ml}$ fraksi tersebut mampu memperpanjang waktu penggandaan sel menjadi dua kali lipatnya dibanding dengan sel kontrol. Adapun pengamatan morfologi sel setelah dilakukan pengecatan dengan *acrydine orange* fraksi F pada kadar 50 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan tanda-tanda apoptosis pada sel. Hasil-hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi F memiliki sifat sitotoksik yang kemungkinan melalui mekanisme *cell cycle arrest* dan apoptosis

Kata kunci: *Erythrina fusca* Lour, fraksinasi, antiproliferatif, sel HeLa

ABSTRACT

In previous study, the bark of ethanolic extract of *E. fusca* exhibit cytotoxic activity on HeLa cell with IC_{50} of 11 $\mu\text{g/ml}$. The aims of this research are to examine cytotoxic activity of selected fraction of methanolic extract of the bark *E. fusca* Lour and to study its inhibitory mechanism of the growing HeLa cells.

Preparation of methanolic extract of the bark have been done by using maseration method, and the fractionation was carried out by using column chromatography. Fraction was grouped as similarity of the TCL profile, resulting in 10 fraction (A-J). Three fraction (F, G and I) were subjected to cytotoxic assay on HeLa cells. The highest cytotoxic activity of the fraction than tested for antiproliferative effect by measuring the doubling time and apoptotic effect by observing the treated cell morphology after staining with acrydine orange.

The result showed the F fraction performed the best cytotoxic activity with IC_{50} of 76 $\mu\text{g/ml}$. In the concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$ the fraction prolonged the cell growth by twice compare to the control cells. . In the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, the fraction induces apoptotic like body formation of the cells. These result suggest that the F fraction possess cycotoxic activity may by inducing cell cycle arrest and apoptosis.

Keywords: *Erythrina fusca* Lour, fractionation, Antiproliferative, HeLa Cell line

PENDAHULUAN

Tumbuhan Cangkring (*Erythrina fusca*, Luor) sering digunakan masyarakat untuk mengobati cacar air namun sejauh ini belum banyak penelitian mengenai tanaman ini yang berkaitan dengan efek farmakologik maupun kandungan senyawa aktifnya. Penelitian beberapa tumbuhan yang termasuk dalam genus *Erythrina* menunjukkan aktivitasnya sebagai inhibitor *Cyclooxygenase* (COX). Ekstrak air, etanol dan etil asetat dari kulit batang dan daun tumbuhan *E.caffra*, *E. humeana*, *E.latissima* dan *E.lysistemon* dilaporkan memiliki aktivitas yang tinggi sebagai inhibitor COX (Pillay *et al.*, 2001). Aktivitas-aktivitas tersebut dapat memiliki makna positif sebagai antitumor karena perkembangan tumor seringkali juga melibatkan enzim COX, khususnya COX 2 (Dubois *et al.*, 1998). Ekstrak metanol daun *E.fusca* Lour juga memiliki kemampuan untuk menghambat enzim *Topoisomerase II* secara *in vitro* (Sismindari *et al.*, 2001). Ekstrak etanol daun dan kulit batang *E.fusca* Lour mempunyai aktivitas sitotoksik secara *invitro* terhadap sel HeLa dengan IC₅₀ masing-masing 14µg/ml dan 11µg/ml (Meiyanto, 2003). Ekstrak metanol relatif tidak toksik pada uji toksisitas akut terhadap tikus jantan galur wistar dengan harga LD₅₀ lebih besar dari 25kg/kgBB (Cahyani, 2003).

Berdasarkan data-data yang tersedia tersebut, maka dapat dikatakan bahwa tumbuhan *E.fusca* Lour memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melacak kandungan dari tumbuhan *E.fusca* yang salah satunya berasal dari kulit batang tanaman tersebut. Salah satu cara adalah dengan melakukan fraksinasi sesuai dengan gradien kepolaran pelarut (Habtemariam, 1990). Fraksi metanol adalah fraksi yang mengandung senyawa-senyawa polar dari tanaman yang kemungkinan memiliki aktivitas sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas sitotoksik fraksi-fraksi ekstrak metanol kulit batang tumbuhan *E.fusca* Lour terhadap sel HeLa, serta mempelajari mekanismenya dengan melihat efek antiproliferasi dan apoptosisnya.

BAHAN DAN METODOLOGI

Bahan Tanaman dan Kultur Sel

Kulit batang tanaman cangkring (*Erythrina fusca* Lour) diambil dari tumbuhan yang berumur lebih dari 4 tahun dan berasal dari daerah Sumber Anom, Moyudan, Sleman, Jogjakarta. Tumbuhan tersebut telah dideterminasi di Fakultas Farmasi UGM. Subjek uji yang digunakan adalah sel HeLa yang merupakan koleksi dari LPPT UGM.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk kulit batang cangkring sebanyak 1,62 kg, dimaserasi dengan pelarut petroleum eter, sisa serbuk dimaserasi dengan kloroform dan kemudian dengan metanol, sampai akhirnya didapat ekstrak metanol sebanyak 35,84g. Sejumlah 15g dari ekstrak ini difraksinasi menggunakan *Vacum Liquid Chromatography*, dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak campuran petroleum eter (PE), kloroform (CHCl₃) dan metanol (CH₃OH) secara gradien.

Uji sitotoksitas terhadap sel HeLa.

Sel (3×10^4) didistribusikan ke dalam sumuran pada *microplate* 96 wells dan diinkubasi bersama sampel uji berbagai seri kadar (20- 312 µg/ml) selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, kepada masing-masing sumuran ditambahkan 15µl MTT 0,3 % dalam PBS. Reaksi dihentikan dengan penambahan SDS 10% setelah 6 jam. Intensitas warna ungu yang terbentuk diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm (Doyle, 2000).

Uji *doubling time* sel

Sel ($1,5 \times 10^4$) dipuasakan (starvasi) dengan media kultur yang mengandung 0,5 % FBS selama 24 jam (Meiyanto *et al.*, 2001), kemudian ditumbuhkan di dalam sumuran yang mengandung sample uji dengan kadar 25, 50 dan 100 µg/ml. Populasi sel pada setiap seri percobaan dihitung pada jam ke-6, 12, 24, 48 dan 72, dengan *hemocytometer* setelah ditambah *tripan blue*, kemudian dibuat kurva jumlah sel *vs* waktu inkubasi. *Doubling time* dihitung dari slop setelah dibuat garis lurus pada kurva (Doyle, 2000).

Pengecatan DNA dengan *Acrydine orange*

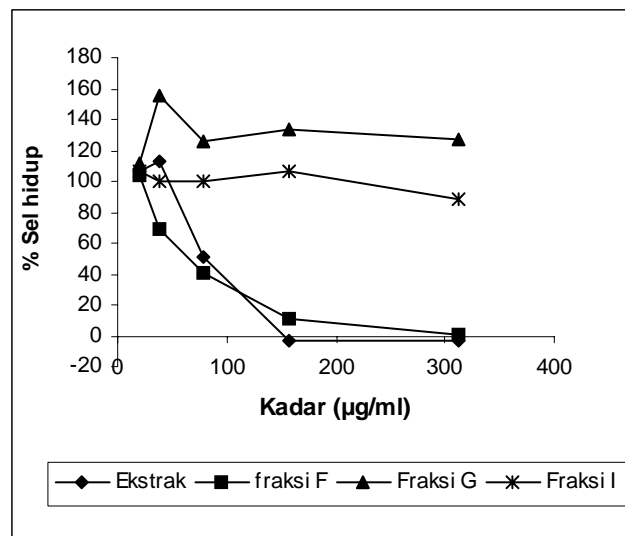
Sel (1×10^4) ditumbuhkan pada *coverslip*, kemudian diinkubasi dengan sample uji kadar 25, 50 dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Pengecatan dengan *acrydine orange* dilakukan pada jam ke-48 dengan pengamatan di bawah mikroskop flouresens (Zeiss MC 80).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksisitas terhadap sel HeLa

Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik fraksi metanol kulit batang *Erythrina fusca* Lour terhadap sel

HeLa, dengan parameter IC_{50} . Uji dilakukan terhadap tiga fraksi yang merupakan representasi fraksi semi polar, yaitu fraksi F,G dan I. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa fraksi G dan I tidak menunjukkan penurunan persen sel hidup sampai pada kadar 312 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi F dan ekstrak metanol menunjukkan penurunan persen sel hidup sebanding dengan kenaikan konsentrasi (Gambar 1). Hasil menunjukkan bahwa fraksi F memiliki potensi yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan sel dengan IC_{50} sebesar 76 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel I).



Gambar 1. Profil efek sitotoksik fraksi F, G, I dan ekstrak metanol kulit batang *Erythrina fusca* Lour terhadap sel HeLa dengan metode MTT. Dilakukan dengan menginkubasi 3×10^4 sel HeLa dengan seri kadar dari 312 $\mu\text{g/ml}$ sampai 20 $\mu\text{g/ml}$

Tabel I. Daftar IC_{50}

Perlakuan	Persamaan garis	R^2	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak methanol	$Y = -5,4016X + 15,536$	0,897	89
Fraksi F	$Y = -4,1735X + 12,854$	0,940	76
Fraksi G	$Y = -0,009X + 8,1106$	0,75	-
Fraksi I	$Y = -1,2584X + 10,029$	0,534	-

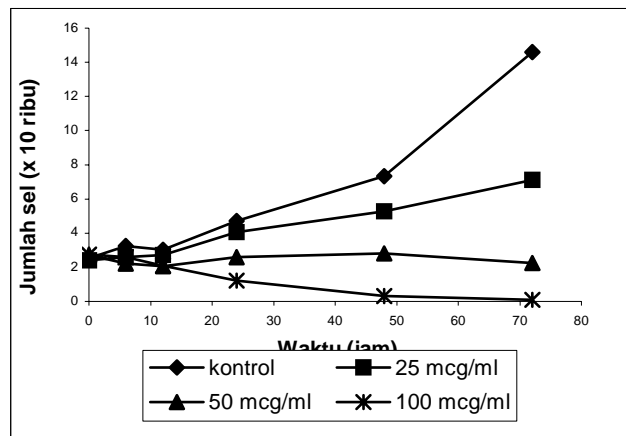
Hasil tersebut memberikan harapan dalam pengembangan fraksi F sebagai agen anti kanker. Sifat sitotoksik dapat dikaitkan dengan kemampuan fraksi F untuk memacu terjadinya *cell cycle arrest* atau memacu apoptosis pada sel uji, untuk itu perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut dengan uji *doubling time* dan pengecatan DNA.

Uji *doubling time* sel

Uji *doubling time* dilakukan untuk mengetahui kemampuan fraksi F untuk menghambat proliferasi sel HeLa. Senyawa yang mampu memperpanjang waktu *doubling time* menunjukkan kemampuan senyawa tersebut untuk menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme *cell cycle arrest*. Uji *doubling time* dilakukan dengan menghitung jumlah sel hidup yang diberi perlakuan dengan fraksi F dalam setiap satuan

waktu. *Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kalinya. Waktu *doubling time* ditentukan dengan ekstrapolasi dari waktu vs log jumlah sel hidup. Hasilnya menunjukkan bahwa pada kadar 25µg/ml fraksi F telah mampu menghambat proliferasi sel secara signifikan. Sementara itu pada kadar 50 dan 100 µg/ml, fraksi tersebut menekan pertumbuhan sel hingga 100% (Gambar 2). Pada kadar 25µg/ml, fraksi F membuat waktu penggandaan sel lebih lama dua kali lipat dibanding sel kontrol (29 jam menjadi 44 jam) (Tabel II).

Hasil tersebut menimbulkan dugaan bahwa fraksi F mengandung senyawa yang dapat membuat *cell cycle arrest*. Kemampuan penghambatan proliferasi sel kanker oleh zat uji dikaitkan pula dengan kemampuan menginduksi apoptosis zat tersebut pada sel.

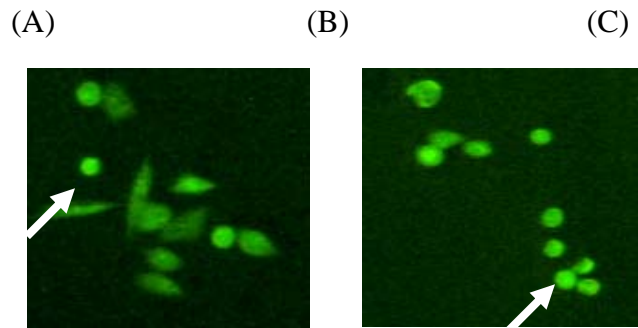


Gambar 2. Profil pertumbuhan sel HeLa hasil uji *doubling time* fraksi F ekstrak metanol kulit batang *Erythrina fusca* Lour kadar 25 µg/ml (plkn 25), 50µg/ml (plkn 50) dan 100 µg/ml (plkn 100) yang dilakukan dengan menginkubasi sel dengan kepadatan 1×10^4 didalam sumuran dengan fraksi 18 ekstrak metanol kulit batang *Erythrina fusca* Lour dan dihitung jumlahnya pada jam ke-6, 12, 24, 48 dan 72.

Tabel II. Daftar waktu *doubling time*

Perlakuan	Persamaan garis	Slope	<i>Doubling time</i>	Linieritas
100µg/ml	$Y = -0,0212X + 4,5273$	-0,0213	-	0,99
50µg/ml	$Y = -3 \times 10^{-5}X + 4,408$	-3×10^{-5}	-	7×10^{-5}
25µg/ml	$Y = 0,0068X + 4,3863$	0,0068	44,27 jam	0,97
Pelarut	$Y = 0,0116X + 4,3394$	0,0116	25,95 jam	0,92
Kontrol	$Y = 0,0103X + 4,4057$	0,0103	29,22 jam	0,98





Gambar 4. Penampakan morfologi DNA sel HeLa pada jam ke-48. Pengecatan dilakukan dengan menggunakan *acrydine orange*. (A) Kontrol sel, (B) Kontrol pelarut (DMSO) 0,5%, (C) Fraksi F kadar 25 µg/ml, (D) Fraksi F kadar 50 µg/ml, (E) Fraksi F kadar 100 µg/ml
(i) sel *sinking* atau terfragmentasi

Pengamatan apoptosis dengan pengecatan DNA

Pengecatan DNA ditujukan untuk melihat adanya fenomena apoptosis dari sel. Pengecatan dilakukan dengan *acrydine orange* yang akan berinterkalasi dengan DNA, sehingga akan menghasilkan fluoresensi hijau, baik pada sel normal, maupun pada badan apoptosis. Zat uji pada kadar 50 µg/ml menyebabkan sel *sinking* (menciut). Fenomena ini semakin menguat dengan bertambahnya kadar, yaitu bertambahnya jumlah sel yang mengalami *sinking* dan kemungkinan terfragmentasi (Gambar 3). Adanya kejadian tersebut menunjukkan bahwa zat uji kemungkinan mampu memacu apoptosis terhadap sel HeLa. Hasil tersebut sesuai dengan hasil uji doubling time yang menunjukkan mulai kadar 50 µg/ml zat uji memberikan nilai *slope* pertumbuhan negatif.

Hasil penelitian ini menunjukkan kemampuan zat uji sebagai anti kanker yang ditunjukkan dengan sifat sitotoksik yang kuat, mampu menghambat proliferasi sel dan kemungkinan mampu memacu apoptosis. Kemampuan tersebut kemungkinan dikarenakan adanya senyawa aktif yang terkandung dalam zat uji. Berdasarkan analisis

kualitatif dengan KLT fraksi F mengandung senyawa golongan flavonoid. Pan *et al.*, (2002) membuktikan bahwa polimetoksi flavonoid yang terdapat pada kulit jeruk (tangeretin), dapat meningkatkan ekspresi Cdk inhibitors seperti p27, p21 pada *colon cancer cell line* (COLO 205). Protein p21 dan p27 merupakan anggota Cip/Kip protein yang dapat membentuk trimer dengan kompleks Cyc D-Cdk (*holoenzim*). Trimer dengan holoenzim akan mengakibatkan holoenzim ini tidak dapat memfosforilasi pRb, sehingga sel akan *arrest* pada G₁. Tangeretin juga telah terbukti dapat menginhibisi Cdk 4 dan 6. Ekspresi Cyc A, Cyc D1 dan Cyc E juga ditekan oleh senyawa tangeretin, pada COLO 205 (Pan *et al.*, 2002). Fraksi F juga mengandung flavonoid, sehingga kemungkinan fraksi F dapat memacu *cell cycle arrest* pada G₁, namun hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut.

Tangeretin juga dapat meningkatkan level p53 pada sel COLO 205 (Pan *et al.*, 2002). p53 merupakan regulator yang dapat memacu ekspresi p21, sehingga dapat menyebabkan *cell cycle arrest* pada G₁ (Andrei, 2002). Pada sel HeLa, protein p53-nya sudah didegradasi oleh E6 yang

diekspresikan oleh HVP. Kemungkinan flavonoid yang terkandung dalam fraksi F dapat meningkatkan level p53. Desaintes *et al.*, (1999) membuktikan bahwa, meningkatnya p53 pada sel HeLa akan meningkatkan ekspresi p21 tetapi tidak meningkatkan ekspresi Bax. Kemungkinan apoptosis terjadi karena meningkatnya ekspresi *downstream* p53 yang lainnya, seperti Noxa, p53AIP1 dan KILLER/DR5 (Nakamura, 2004). Overekspresi Noxa pada sel HeLa dapat menyebabkan apoptosis >90% Noxa juga telah terbukti dapat memacu apoptosis pada *cell line* yang lain (Lee *et al.*, 2003).

KESIMPULAN

Fraksi semi polar ekstrak metanolik kulit batang tanaman cangkring memiliki sifat sitotoksik yang poten. Sifat sitotoksik tersebut berhubungan dengan penurunan proliferasi dan kemungkinan pemacuan apoptosis. Penelitian ini telah membuka peluang untuk penelitian lanjut guna menelusuri mekanisme molekulernya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih diucapkan kepada QUE Project Fakultas Farmasi 2003 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrei L. Gartel and Angela L.T., The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis 1, 2002, *Molecular Cancer Therapeutics*, **1**, 639-649.
- Cahyani, A., 2003, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Cangkring (*Erythrina fusca* Lour) pada Tikus Jantan Wistar serta Profil KLT Senyawa Kimianya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., and Thierry, F., 1999, Papillomavirus E2 Induces p53-independent Apoptosis in HeLa Cell, *Oncogene*, **18**, 4583-4545.
- Doyle, A., and Griffiths J.B., 2000, *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Willey & Sons LTD, England.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van de Putte, L.B., and Lipsky, P.E., 1998, Cyclooxygenase in

Biology and Disease, *FASEB J*, **12**, 1063-1073.

- Habtemariam, S., Gray, A.L., Halbert, G.W., waterman, P.G., 1990, A Novel Antibacterial Diterpene from *Premna schimperi*, *Planta Medica*, **56**, 187-190
- Lee, S.H., Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, H.S., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Kim, S.Y., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., 2003, Mutational Analysis Of Noxa Gene In Human Cancers, *APMIS*, **111**, 599-604.
- Meiyanto, E., Hoshijima, M., Ogawa, T. Ishida, N., and Takeya, T., 2001, Osteoclast Differentiation Factor Modulates Cell Cycle Machinery and Causes a Delay in S Phase Progression in RAW264 Cells, *Biochem Biophys Res Com.* **282**, 278-283.
- Meiyanto, E., Sismindari, Kusnandar L.C., Moordiani, 2003, Efek Anti Proliferatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca* Lour) terhadap Sel HeLa, *MFI*, **14**, 124-131.
- Nakamura, Y., 2004, Isolation of p53-target genes and their functional analysis, *Cancer Sci*, **95** (1), 7-11.
- Pan, M.H.m Chen, W.J., Shiau, S.Y.L., Ho, C.T., Lin, J.K., 2002, Tangeretin Induces Cell-Cycle G₁ Arrest Through Inhibiting Cyclin-Dependent Kinase 2 and 4 Activities as well as Elevating Cdk Inhibitors p21 and p27 in Human Colorectal Carcinoma Cells, *Carcinogen*, **23** (10), 1677-1684.
- Pillay, C.C.N., Jager, A.K., Mulholland, D.A., and Staden, J.V., 2001, Cyclooxygenase Inhibiting and Antibacterial Activities of South African *Erythrina* Species, *J.f.Pharm*, **74** (3), 231-237.