

Fraksi n-butanolik kapang endofit Buah Makasar meningkatkan efek apoptosis doxorubusin pada sel MCF-7

n-Butanolic fraction of endofitic fungi of Buah Makasar increases apoptotic effect of doxorubicin on MCF-7 cells

Shirly Kumala¹⁾, Endah Puji Septisetyani²⁾ dan Edy Meiyanto^{2*)}

¹⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

²⁾ CCRC Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

Abstrak

Buah Makassar, *Brucea javanica* (L.) Merr., telah dibuktikan memiliki aktivitas kemopreventif. Metabolit sekunder yang dihasilkan pada buah *B. javanica*, di antaranya brusatol dan bruceantin, mampu memacu diferensiasi sel dan apoptosis pada sel Leukemia sedangkan quassinoid dan turunannya dapat berperan sebagai *antitumor promoter*. Fraksi n-butanolik (FB) dari supernatan hasil fermentasi isolat kapang endofit 1.2.11 yang diisolasi dari buah *B. javanica* telah terbukti menunjukkan aktivitas sitotoksik pada beberapa sel kanker. Fraksi tersebut diprediksi mengandung metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *B. javanica* dan telah diidentifikasi mengandung turunan Bruceosin dan Canthin-6-one. FB dari supernatan hasil fermentasi isolat kapang endofit 1.3.11 diperkirakan memiliki aktivitas sitotoksik yang sebanding dengan FB yang didapat dari isolat 1.2.11. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi sitotoksik dan pemacuan apoptosis FB yang didapat dari isolat 1.3.11 serta efek kombinasi perlakuan FB-doxorubicin pada sel kanker payudara MCF-7.

Efek sinergis kombinasi FB-doxorubicin dilihat pada penekanan viabilitas sel dan pemacuan apoptosis sel MCF-7 yang resisten terhadap doxorubicin. Viabilitas sel pada perlakuan tunggal FB dan doxorubicin maupun perlakuan kombinasi keduanya ditentukan dengan *MTT assay* untuk mendapatkan nilai IC_{50} dan indeks kombinasi (CI). Efek pemacuan apoptosis FB, doxorubicin, dan kombinasi keduanya ditentukan dengan pengecatan DNA menggunakan etidium bromida-akridin oranye.

Fraksi Butanoid dan doxorubicin menunjukkan penekanan viabilitas sel MCF-7 dengan IC_{50} berturut-turut 48 $\mu\text{g/mL}$ dan 148 nM. Keduanya mampu memacu apoptosis pada IC_{50} . Sinergisme FB-doxorubicin terlihat dari nilai CI (<0,9) dan penguatan insidensi apoptosis pada sel MCF-7.

Kata kunci: *Brucea javanica*, kapang endofit, sel MCF-7, sinergisme, doxorubicin.

Abstract

Makassar fruit, *Brucea javanica* (L.) Merr., showed chemopreventive activity. Secondary metabolites come from *B. javanica* fruit, brusatol and bruceantine, induced cell differentiation and apoptosis on Leukemia cell, while quassinoid and its derivatives acted as antitumor promoter. Butanolic fraction of supernatan of endofitic fungi 1.2.11 isolate fermentation which isolated from *B. javanica* fruit showed cytotoxicity toward several cancer cells. This fraction has been predicted contain secondary metabolites from *B. javanica* and has been identified as Bruceosin and Canthin-6-one derivatives. Butanolic fraction (FB) of supernatan from endofitic fungi 1.3.11 isolate fermentation is predicted for having similiar cytotoxicity as active as 1.2.11 isolate. This research is aimed to explore cytotoxicity potentiation dan

apoptosis induction of BF from 1.3.11 isolate and combination effect of BF-doxorubicin on MCF-7 breast cancer cell.

Synergism of BF-doxorubicin combination detect from cell viability inhibition and apoptosis induction on MCF-7, a breast cancer cell lines which shows resistancy toward doxorubicin. Cell viability on single treatment of FB and doxorubicin and its combination were carried out by MTT assay to determine IC₅₀ and combination index (CI). Apoptosis induction of FB, doxorubicin and its combination were carried out by ethidium bromide-acridine orange DNA staining.

n- Butanolic fraction and doxorubicin showed cell viability inhibition on MCF-7 cell with IC₅₀ 48 µg/mL dan 148 nM, respectively. Both of FB and doxorubicin showed apoptosis induction on IC₅₀. Combination of FB-doxorubicin showed synergism and increased apoptosis induction on MCF-7 cell.

Key words: *Brucea javanica*, endofitic fungi, MCF-7 cell, synergism, doxorubicin.

Pendahuluan

Buah Makassar, *Brucea javanica* (L.) Merr., berpotensi sebagai agen kemopreventif karena mengandung senyawa-senyawa yang telah diteliti memiliki sifat sitotoksik. Rahman *et al.* (1999) melaporkan bahwa 3 turunan quassinoid dari *B. javanica*, yaitu desmetil-brusatol, desmetil-bruceantinoside A, dan butil ester dari bruceoside D memiliki efek penghambatan terhadap aktivasi *Epstein-Barr virus* (EBV). Turunan quassinoid tersebut bertindak sebagai antitumor promoter. Quassinoid dan alkaloid dari *B. javanica* juga dilaporkan memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker yang telah mengalami resistensi multiobat (*multidrug resistance*).

Cuendet *et al.* (2004) melaporkan bahwa bruceantin mampu menginduksi terjadinya diferensiasi sel dan apoptosis. Metabolit sekunder yang berbeda, Brusatol, juga dilaporkan dapat memacu diferensiasi sel Leukemia (Mata-Greenwood *et al.*, 2002). Dari penelitian-penelitian tersebut dapat diketahui bahwa berbagai senyawa yang diisolasi dari *B. javanica* memiliki potensi sebagai kemopreventif dengan mekanisme pemacuan diferensiasi sel dan apoptosis. Dari kedua mekanisme yang telah diteliti tersebut, dimungkinkan bahwa senyawa-senyawa tersebut berpotensi untuk dikembangkan dalam terapi pendamping (kombinasi) obat antikanker konvensional seperti doxorubicin untuk meningkatkan sensitivitas sel kanker, menghindari resistensi obat serta menurunkan resiko toksisitas.

Kumala (2005) telah melakukan penelitian mengenai kapang endofit yang

diisolasi dari buah *B. javanica* yang berasal dari Cianjur. Isolat 1.2.11 yang diidentifikasi sebagai *Fusarium chlamydosporum* tersebut dapat menghasilkan metabolit yang memiliki efek sitotoksik pada beberapa jenis sel kanker meski laporan mengenai kandungan metabolit tersebut masih terbatas. Ekstrak n-butanol (EB) dari supernatan hasil fermentasi memiliki IC₅₀ berturut-turut sebesar 4 µg/mL pada sel Leukimia 1210, 58 µg/mL pada sel Raji, 162 µg/mL pada sel NS-1, 361 µg/mL pada sel HeLa dan 1075 µg/mL pada sel Vero.

Ekstrak tersebut diprediksi mengandung metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *B. javanica* dan telah diidentifikasi mengandung turunan Bruceosin dan Canthin-6-one. Fraksi n-butanolik (FB) dari supernatan hasil fermentasi isolat kapang endofit 1.3.11 diperkirakan memiliki aktivitas sitotoksik yang sebanding dengan EB yang didapat dari isolat 1.2.11. Diharapkan FB dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doxorubicin. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi sitotoksik dan pemacuan apoptosis FB yang didapat dari isolat 1.3.11 serta efek kombinasi perlakuan FB-doxorubicin pada sel kanker payudara MCF-7.

Metodologi

Bahan

Fraksi n-butanolik (FB) diperoleh dari ekstraksi supernatan hasil fermentasi kapang endofit isolat 1.3.11 dari Buah Makassar koleksi Dr. Shirley Kumala dengan n-butanol setelah sebelumnya diekstraksi secara bertingkat dengan n-heksan dan etil asetat. Agen kemoterapi doxorubicin yang digunakan dalam penelitian merupakan sediaan

injeksi parenteral Doxorubicin Ebewe (vial 10mg/5mL) yang diperoleh dari P.T. Ferron Par Pharmaceutical (Cikarang, Indonesia). Larutan induk dari senyawa uji selalu dibuat baru dengan melarutkan dalam DMSO (DMSO 99,5 % pro GC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany).

Kultur sel

Sel kanker payudara T47D dan MCF-7 yang digunakan merupakan koleksi Dr. Edy Meiyanto, M.Si., Apt., yang diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) yang mengandung *foetal bovine serum* (FBS) 10 % (v/v) (FBS *qualified*, Gibco, Invitrogen™, USA), dan antibiotika penisilin-streptomisin 1 % (v/v) (Gibco, Invitrogen Corporation, USA). Sel dipanen dari *culture dish/flask* dengan tripsin-EDTA 0,025 % (Gibco, Invitrogen, Canada).

Penentuan IC₅₀ dan indeks kombinasi (CI) dengan MTT assay

Kultur sel T47D dan MCF-7 yang telah konfluen dipanen dan didistribusikan ke dalam sumuran (5000 sel/sumuran). Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ untuk normalisasi sehingga siap untuk perlakuan. Larutan uji dengan seri konsentrasi dimasukkan ke dalam sumuran (triplo) setelah sel dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Sel diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO₂. Setelah inkubasi, larutan uji dibuang dan ditambahkan pereaksi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida (MTT) 0,5mg/mL dalam media sebanyak 100 µL/sumuran. Pereaksi *sodium dodecyl sulphate* (SDS; E.Merck, Germany) dalam HCL 0,1N (E.Merck, Germany) ditambahkan setelah inkubasi 3 jam. Sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Absorbansi tiap sumuran diukur menggunakan *microplate reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark serial no. 11565*, Jepang) pada λ 595 nm. Untuk menentukan IC₅₀, dihitung persentase viabilitas sel kemudian dilakukan analisis regresi linier dengan Microsoft Excell 2003. Nilai CI dihitung dan dianalisis berdasarkan Chou. Nilai CI kurang dari 0,9 menunjukkan sinergisme perlakuan kombinasi (Reynolds and Maurer, 2005). Sel diamati dengan mikroskop *inverted* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany) dengan perbesaran 400x.

Pengamatan apoptosis

Sebanyak 50.000 sel/sumuran ditanam di atas *cover slip*. Setelah inkubasi 24 jam, sel diberi perlakuan baik tunggal maupun kombinasi dan

diinkubasi kembali selama 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci PBS kemudian ditambahkan 10 µl pereaksi etidium bromida-akridin oranye (Sigma, USA) (masing-masing 5µg/mL dalam PBS). Sel diamati di bawah mikroskop fluoresen (Carl Zeiss AxioLab HB50, Germany) dengan perbesaran 400x. Sel berfluorosensi hijau menunjukkan sel hidup sedangkan sel berfluorosensi merah menunjukkan sel mati. Sel apoptosis pada tahap awal akan mengalami fragmentasi nukleus dan masih berfluorosensi hijau dan pada tahap akhir terjadi fragmentasi sel dan fluorosensi merah.

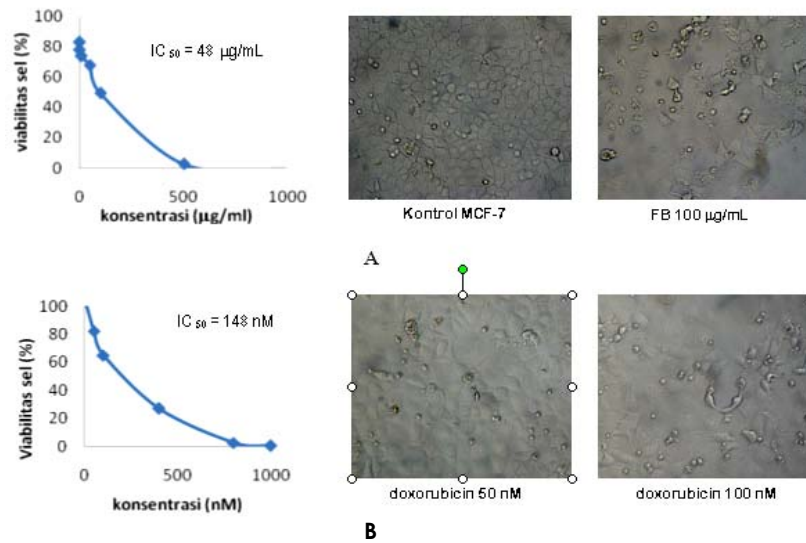
Hasil Dan Pembahasan

Profil viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan FB dan doxorubicin

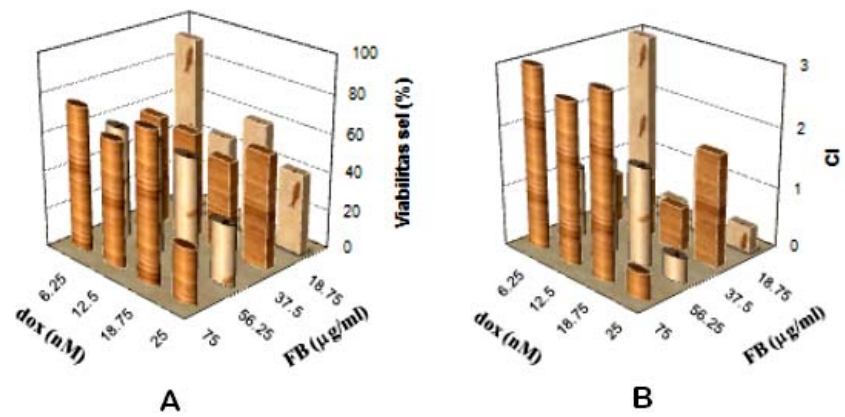
Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel MCF-7 untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan fraksi *n*-butanol (FB) dan doxorubicin. Sel yang digunakan merupakan sel kanker payudara yang berasal dari sel epitel duktus dan menunjukkan resistensi terhadap doxorubicin. Sel MCF-7 mengekspresikan protein transporter *P-glycoprotein* (Pgp) yang akan mengeluarkan doxorubicin dari dalam sel (Györfy *et al.*, 2008). Uji sitotoksik dilakukan untuk menentukan potensi sitotoksik kedua bahan uji dengan parameter kadar ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50 % (IC₅₀). Baik FB maupun doxorubicin menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tergantung dosis pada sel MCF-7 dengan IC₅₀ berturut-turut 48 µg/mL dan 148 nM (Gambar 1).

Perlakuan kombinasi FB-doxorubicin pada sel MCF-7

Perlakuan kombinasi antara FB dan doxorubicin menunjukkan sinergisme yang kuat pada sel MCF-7 berdasarkan pada nilai CI (Gambar 2, Tabel 1). Nilai CI dari perlakuan kombinasi tersebut mencapai 0,31. Fenomena ini sangat menarik mengingat sel MCF-7 merupakan sel yang resisten terhadap doxorubicin. Hal ini menunjukkan bahwa FB dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doxorubicin. Untuk melihat sinergisme tersebut dalam pemacuan apoptosis sel MCF-7 maka dilakukan pengecatan DNA dengan etidium bromida dan akridin oranye pada perlakuan tunggal dan kombinasi.



Gambar 1. Profil viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan dengan fraksi n-butanol (FB) (A) dan doxorubicin (B). Sejumlah 5000 sel/seumuran didistribusikan ke dalam 96-well plate. Setelah 24 jam, sel diberi perlakuan dengan FB dan doxorubicin dan diperlakukan sesuai dengan prosedur *MTT assay*.



Gambar 2. Profil viabilitas sel dan CI setelah perlakuan kombinasi FB dengan doxorubicin. (A) Profil viabilitas sel dan (B) CI pada sel MCF-7 setelah perlakuan kombinasi FB-doxorubicin pada berbagai konsentrasi. Kombinasi FB dengan doxorubicin menunjukkan sinergisme yang lebih kuat pada sel MCF-7.

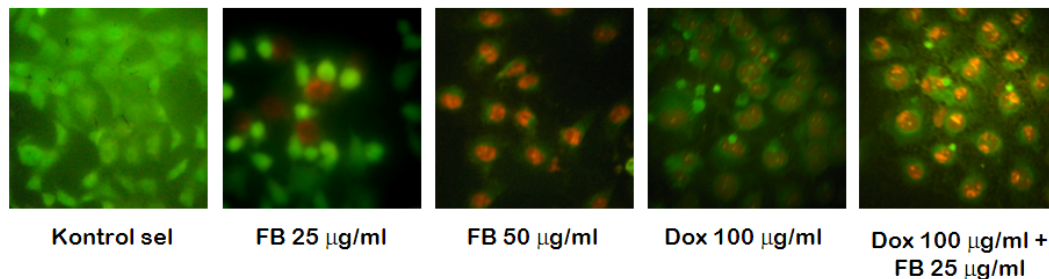
Pemacuan apoptosis perlakuan FB dan doxorubicin tunggal dan kombinasi

Bahan uji FB maupun doxorubicin menunjukkan pemacuan apoptosis pada sel MCF-7. FB dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doxorubicin sehingga pemacuan apoptosis doxorubicin pada sel

MCF-7 diperkuat (Gambar 3). Hal ini dapat dilihat dari fragmentasi inti sel yang lebih nyata pada perlakuan kombinasi. Secara keseluruhan, hasil ini konsisten dengan nilai CI di mana kombinasi FB-doxorubicin menunjukkan sinergisme pada sel MCF-7.

Tabel I. Nilai indeks kombinasi (CI) fraksi n-butanol dengan doxorubicin pada sel MCF-7

		Doxorubicin (nM)			
		18.75	37.5	56.25	75
FB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6.25	6.09	0.85	1.16	3.68
	12.5	0.37	0.97	1.51	2.65
	18.75	1.30	0.74	1.61	7.09
	25	0.42	1.85	0.41	0.43



Gambar 3. Pemacuan apoptosis sel MCF-7 pada perlakuan FB-doxorubicin tunggal dan kombinasi. Sel diinkubasi dengan FB dan doxorubicin baik tunggal maupun kombinasi selama 24 jam. Selanjutnya sel dicat dengan etidium bromida dan akridin oranye. Pada sel MCF-7, FB konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mampu meningkatkan sensitivitas sel sehingga pemacuan apoptosis oleh doxorubicin diperkuat. Keterangan: sel berfluoresensi hijau: sel hidup, sel berfluoresensi oranye: sel mati, fragmentasi inti sel maupun fragmentasi sel menunjukkan insidensi apoptosis.

Pembahasan

Kebutuhan akan obat antikanker yang selektif dan murah masih sangat tinggi sehingga penelitian-penelitian dalam rangka penemuan obat antikanker masih terus dikembangkan. Dewasa ini, pada banyak penderita kanker telah terjadi peningkatan resistensi sel-sel kanker terhadap obat antikanker konvensional. Kemampuan sel kanker untuk mengekspresikan gen *mdr1* dan menghindari dari mekanisme apoptosis mengakibatkan sel tersebut tetap bertahan hidup, tumbuh dan berkembang menjadi sel yang resisten. Pengembangan senyawa-senyawa kemopreventif dalam terapi kombinasi diperlukan untuk meningkatkan efektifitas terapi kanker, selain dapat mengurangi resiko resistensi sel kanker juga mengurangi resiko akibat administrasi obat antikanker konvensional (Notarbartolo *et al.*, 2005).

Sel MCF-7 merupakan salah satu sel kanker payudara yang mengekspresikan *mdr1* sehingga memiliki level Pgp yang tinggi. Ekspresi P-glikoprotein (Pgp) yang tinggi

menyebabkan sel MCF-7 resisten terhadap agen kemoterapi (Györfy *et al.*, 2008). Sel MCF-7 menunjukkan sensitivitas yang rendah terhadap doxorubicin dengan IC_{50} doxorubicin 148 nM. Resistensi MCF-7 terhadap doxorubicin diperantarai oleh peningkatan ekspresi Pgp yang memompa doxorubicin keluar dari sel seperti halnya pada sel kanker lainnya (Györfy *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2005). Bahan uji FB menunjukkan sitotoksitas yang cukup kuat pada sel MCF-7 dengan IC_{50} 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan memacu apoptosis sel MCF-7. Kombinasi doxorubicin dengan FB dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doxorubicin sehingga memperkuat pemacuan apoptosis sel MCF-7.

Sinergisme FB-doxorubicin dapat terjadi melalui peningkatan konsentrasi doxorubicin di dalam sel. Meskipun belum terdapat penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas molekuler FB, dimungkinkan FB mampu menghambat aktivitas Pgp. Sinergisme juga dapat terjadi melalui modulasi protein-protein seluler yang terlibat dalam regulasi daur sel maupun

apoptosis. Sinergisme 2 agen yang berbeda dapat terjadi melalui mekanisme molekuler yang berbeda. Mekanisme yang memperantarai sinergisme kombinasi ini perlu ditelusuri lebih lanjut. Secara keseluruhan, hal ini sangat menarik dan berpotensi untuk diteliti dan dikembangkan lebih lanjut mengingat sel MCF-7 mewakili sel resisten agen kemoterapi.

Kesimpulan

FB dan doxorubicin menunjukkan penekanan viabilitas sel MCF-7 dengan IC₅₀

berturut-turut 48 µg/mL dan 148 nM. Keduanya mampu memacu apoptosis pada IC₅₀. Sinergisme FB-doxorubicin terlihat dari nilai CI (<0,9) dan penguatan insidensi apoptosis sel MCF-7.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Ditjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Bersaing XVI Tahun Anggaran 2008.

Daftar Pustaka

- Cuendet, M., Christov, K., Lantvit, D.D, Deng, Y., Hedayat, S., Helson, L., McChesney, J.D., and Pezzuto, J.M., 2004, Multiple Myeloma Regression Mediated by Bruceantin, *Clinical Cancer Research*, 10:1170-1179.
- Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Sayegh, M.H., Sadee, W. and Frank, M.H., 2005, ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma, *Cancer Research*, 65(10):4320-4333.
- Györfy, B., Serra, V., Jurchott, K., Abdul-Ghani, R., Garber, M., Stein, U., Petersen, I., Lage, H., Dietel, M. and Schafer, R., 2008, Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug-resistant cell lines correlates with patient survival, *Nature*, ISSN:0950-9232, EISSN:1476-5594.
- Kumala, S., 2005, Isolasi dan Penapisan Mikroba Endofit Tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. Serta Uji Sitotoksik Metabolit Sekunder Terhadap Beberapa Sel Kanker Secara *In Vitro*, *Disertasi*, Program Studi Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Mata-Greenwood, E., Cuendet, M., Sher, D., Gustin, D., Stock, W., and Pezzuto, J.M., 2002, Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G₁ arrest is associated with down-regulation of *c-myc*, *Leukemia*, 16 (11): 2275-2284.
- Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., D'Alessandro, N., 2005, Antitumor Effects of Curcumin, Alone or in Combination with Cisplatin or Doxorubicin, on Human Hepatic Cancer Cells, Analysis of Their Possible Relationship to Changes in NF-κB Activation Levels and in IAP Gene Expression, *Elsevier-Cancer Letters*, 224: 53-65.
- Rahman, S., Fukamiya, N., Tokuda, H., Nishino, H., Tagahara, K., Lee, K., Okano, M., 1999, Three New Quassinoid Derivatives and Related Compounds as Antitumor Promoters from *Brucea javanica*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 72 (4): 751-756.

* Korespondensi : Dr Edy Meiyanto, M.Si., Apt.
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara Yogyakarta, 55281. Telp. 0274-543120
E-mail:meiyan_e@ugm.ac.id