

## **Ekstrak n-Heksana Jinten Hitam (*Nigella sativa* Linn) Meningkatkan Aktivitas Estrogenik pada Sel CHO-K1**

### ***Black cumin n-Hexane Extract (Nigella sativa Linn) Increases Estrogenic Activity in CHO-K1 Cells***

**Hilyatul Fadliyah, Idlohatud Dilalah, Gergorius Gena M., Faradiba Nur A., Nadya Rizky S., Riris Istighfari Jenie\***

Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jalan Sekip Utara 55281 (Telp. 0274 6492662 Fax. 543120)

\*corresponding author e-mail : [riris.jenie@ugm.ac.id](mailto:riris.jenie@ugm.ac.id)

#### **ABSTRACT**

*Estrogen plays a role in cell proliferation, differentiation, and specific organ function. Estrogen hormone deficiency leads to various impaired physiological functions. The phenomenon of estrogen deficiency can be overcome by utilizing phytoestrogens. This study aims to determine the potential of black cumin in modulating estrogenic effects on CHO-K1 cells. Black cumin was macerated for 42 hours to obtain a viscous extract (BCE). The phytochemical profiling of BCE identified using thin layer chromatography (TLC). The estrogenic activity assay included cytotoxic and proliferation test by MTT method, observation test of proliferative marker protein expression cyc-E using Western Blot method, and molecular test of molecular compound of timokuinon with proliferation protein in silico. Spots on the chromatogram showed a position adjacent to the comparative patches used. The results of cytotoxic tests showed proliferative phenomena predicted to occur at concentrations below 200 µg/mL and confirmed in the proliferation test. The highest intensity of protein expression cyc-E was achieved at concentrations 200 µg/mL. These in vitro data are reinforced with in silico data which proved the possibility of interaction between BCE content with target compounds can occur due to the same environment. Thus, it can be said BCE is able to modulate estrogenic effects on CHO-K1 cells with a tendency to increase its effect, thus potential to be developed further as phytoestrogen product.*

**Keywords :** *black cumin (Nigella sativa), phytoestrogen, CHO-K1.*

#### **ABSTRAK**

Estrogen berperan dalam proliferasi sel, diferensiasi, dan fungsi organ spesifik. Defisiensi hormon estrogen menimbulkan berbagai gangguan fungsi fisiologis. Fenomena defisiensi estrogen dapat diatasi dengan memanfaatkan fitoestrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi jinten hitam dalam memodulasi efek estrogenik pada sel CHO-K1. Jinten hitam diekstraksi dengan metode maserasi selama 42 jam sehingga diperoleh ekstrak kental (EJH). Profil fitokimia ekstrak kental menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji aktivitas estrogenik meliputi uji sitotoksik dan proliferasi menggunakan metode MTT, uji pengamatan ekspresi protein penanda proliferasi cyc-E menggunakan metode *Western blot*, dan uji interaksi molekuler senyawa timokuinon dengan protein proliferasi secara *in silico*. Bercak pada kromatogram menunjukkan posisi yang berdekatan dengan bercak pembanding yang digunakan. Hasil uji sitotoksik menunjukkan fenomena proliferasi diprediksi terjadi pada konsentrasi di bawah 200 µg/mL dan terkonfirmasi pada uji proliferasi. Intensitas ekspresi protein cyc-E paling tinggi terjadi pada konsentrasi 200 µg/mL. Data-data *in vitro* ini diperkuat dengan data *in silico* yang membuktikan bahwa

kemungkinan interaksi antara senyawa kandungan EJH dengan senyawa target dapat terjadi karena lingkungan yang sama. Dengan demikian, EJH mampu memodulasi efek estrogenik pada sel CHO-K1 dengan kecenderungan meningkatkan efeknya sehingga potensial dikembangkan sebagai produk fitoestrogen.

**Kata kunci :** jinten hitam (*Nigella sativa*), fitoestrogen, CHO-K1.

## PENDAHULUAN

Wanita rentan mengalami gangguan kesehatan diakibatkan oleh defisiensi atau kekurangan yang salah satu hormon seks yang berperan penting, yakni estrogen. Estrogen berperan dalam pertumbuhan atau proliferasi sel, diferensiasi, dan fungsi organ spesifik (O'lane *et al.*, 2004). Pada organ seksual, estrogen mengatur siklus menstruasi dan reproduksi, menstimulasi proliferasi sel-sel epitel uterus, jaringan duktus, dan kelenjar pada payudara (Berry *et al.*, 2003). Defisiensi hormon estrogen menimbulkan berbagai gangguan fungsi fisiologis seperti osteoporosis dan penyakit kardiovaskular seperti hiperkolesterolemia (Kenny *et al.*, 2000). Kondisi ini biasanya terjadi pada masa *post menstrual* atau menopause yang merupakan proses alamiah yang akan dialami oleh setiap wanita.

Fenomena defisiensi estrogen dapat diatasi dengan memanfaatkan tumbuhan yang mudah diperoleh. Tumbuhan yang dapat dijadikan sumber estrogen eksternal disebut fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan dekomposisi alami dalam tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, suatu bentuk alami estrogen yang paling poten (Jefferson *et al.*, 2002). Berdasarkan penelitian *in vivo*, jinten hitam atau habbatussauda (*Nigella sativa* L.) diketahui berpotensi sebagai fitoestrogen (Parhizkar *et al.*, 2011). Biji dari *N. sativa* L. mengandung senyawa aktif minyak esensial, seperti timokuinon, ditimokuinon, timohidrokuinon, dan timol, dan alfa hederin ( $\alpha$ -hederin) (Ekowati *et al.*, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi jinten hitam dalam memodulasi efek estrogenik pada sel CHO-K1. Posisi penelitian ini sebagai sumber

informasi terkait penelusuran potensi estrogenik tumbuhan jinten hitam, dengan melakukan pendekatan yang berbeda dari penelitian terdahulu, yakni secara *in vitro* dan *in silico*. Penelitian secara *in vitro* dilakukan melalui pengamatan indikator proliferasi sel dan protein penanda (*marker*) proliferasi. Sementara secara *in silico*, dipelajari interaksi antara timokuinon, salah satu kandungan jinten hitam yang diprediksi bertanggung jawab terhadap efek estrogenik, dengan reseptor estrogen. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi pengembangan produk farmasetika dari tumbuhan yang berpotensi sebagai fitoestrogen, solusi pengatasan defisiensi hormon estrogen.

## METODE PENELITIAN

**Preparasi Bahan Uji** - Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang diperoleh dideterminasi di UPT Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur. Ekstraksi serbuk biji jinten hitam sebanyak 10 gram dilakukan secara maserasi dengan 100 ml n-heksana selama 42 jam. N-heksana dibiarkan menguap pada suhu kamar hingga dihasilkan sisa ekstrak kasar (EJH). Sisa ekstrak kasar yang dihasilkan dilarutkan dalam 5 mL dimetil sulfoksida (DMSO) dan disimpan dalam suhu -20°C (Khader *et al.*, 2009).

**Subyek Uji** - Sel CHO-K1 (Koleksi CCRC Fakultas Farmasi UGM) diperoleh dari Prof. Masashi Kawaichi (Nara Institute of Science and Technology, NAIST, Japan). Sel dikultur dalam media Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) high glucose (Sigma) dengan 10% FBS (Sigma), HEPES,

sodium bikarbonat, 1.5% Penicilin-Streptomycin and 0.5% Fungizone (Gibco).

**Kromatografi Lapis Tipis** - Kandungan timokuinon dalam EJH diidentifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase gerak yang digunakan adalah toluen : etil asetat (93:7% v/v).

**Uji Proliferasi dengan MTT Assay** - Sebelum melakukan uji proliferasi, dilakukan uji sitotoksik terlebih dahulu. Baik uji sitotoksik maupun uji proliferasi dilakukan dengan metode MTT dengan membedakan jumlah sel yang ditanam, sebanyak  $8 \times 10^3$  sel/well untuk uji sitotoksik dan  $3 \times 10^3$  sel/well untuk uji proliferasi. Sel CHO-K1 yang telah 80% konfluen dipanen dan diberi perlakuan EJH berbagai konsentrasi (10, 50, 250, 500, 750, dan 1000  $\mu\text{L/mL}$ ). Kontrol tanpa perlakuan (PBS) digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  selama 1x24 jam. Setelah inkubasi larutan uji dibuang, dicuci dengan PBS dan ditambahkan reagen MTT 100  $\mu\text{L}$ /sumuran. Setelah inkubasi selama 3 jam, reagen dibuang ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,01 N HCl, kemudian *well plate* digoyang horizontal (shaker) selama 10 menit, kemudian dibaca dengan ELISA reader pada  $\lambda = 595$  nm dan akan diperoleh serapan yang menyatakan absorbansi sel yang hidup.

**Western Blot** - Sel CHO-K1 ditanam pada 24 *well plate* sampai 80 % konfluen. Setelah itu diinkubasi dengan EJH selama 24 jam. Sel yang telah diinkubasi dipanen dan dilisis untuk mengekstraksi protein. Selanjutnya, dilakukan analisis protein dengan metode Bradford. Lisat dipisahkan dengan metode elektroforesis. Hasil pemisahan *gel* elektroforesis ditransfer ke membran PVDF dan kemudian dilakukan *blotting*. Dilanjutkan dengan pemberian antibodi primer, sekunder, dan deteksi visual menggunakan ECL.

**Molecular Docking** - Data protein target ER diolah menggunakan *software* YASARA. Preparasi struktur senyawa uji timokuinon dengan struktur tiga dimensi dibuat dengan *software* MarvinSketch. Validasi pemilihan metode ditentukan oleh harga RMSD (*Root Mean Square Distances*) *heavy atom* (ligan) dengan ligan copy dan harga RMSD kurang dari 2 Å. Kemudian dilakukan docking ligan dengan protein target menggunakan *software* PLANTS. Dilakukan *scoring* terhadap hasil *docking* tersebut. Output yang diperoleh menyatakan kekuatan interaksi ligan-reseptor berupa  $\Delta G$  (energi Gibbs).

**Analisis Data** - Data hasil *MTT Assay* yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{sel hidup} = \frac{\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}}$$

Kemudian dihitung konsentrasi  $\text{IC}_{50}$  berdasarkan kurva konsentrasi vs persen viabilitas sel.

Analisis data dari metode *Western blot* dilakukan dengan mengukur intensitas pita dengan *software ImageJ*. Hasil *molecular docking* akan diperoleh  $\Delta G$  yang menunjukkan kekuatan ikatan antara ligan dan reseptor. Semakin rendah harga  $\Delta G$ , maka ikatannya semakin kuat dan stabil. Sebaliknya, semakin tinggi  $\Delta G$ , maka ikatannya semakin lemah dan tidak stabil.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui kandungan dalam EJH dilakukan identifikasi golongan menggunakan KLT dengan sistem sebagaimana pada bagian metode.

Identifikasi yang dilakukan merupakan uji identifikasi golongan sehingga senyawa pembanding yang digunakan adalah senyawa terpen yang memiliki golongan yang sama dengan timokuinon yaitu timol yang merupakan golongan terpenoid. Faktor utama yang diamati adalah warna pendaran bercak antara senyawa uji dan senyawa pembanding.

Berdasarkan penelitian sebelumnya bercak profil KLT senyawa golongan terpenoid memiliki pendaran warna biru apabila disemprot dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat (Hertiani *et al*, 2007). Hasil pengamatan plat KLT di bawah sinar tampak, UV 366, dan UV 254 menunjukkan adanya bercak golongan terpenoid ditandai dengan pendaran berwarna biru pada masing-masing bercak (Gambar 1). Dengan demikian, EJH mengandung senyawa golongan terpenoid yang dimungkinkan senyawa tersebut adalah timokuinon.



**Gambar 1.** Profil KLT di bawah (a) sinar tampak, (b) sinar UV 254nm dan (c) sinar UV 366 nm). Hasil pengamatan plat KLT menunjukkan adanya bercak golongan terpenoid ditandai dengan pendaran berwarna biru pada masing-masing bercak.

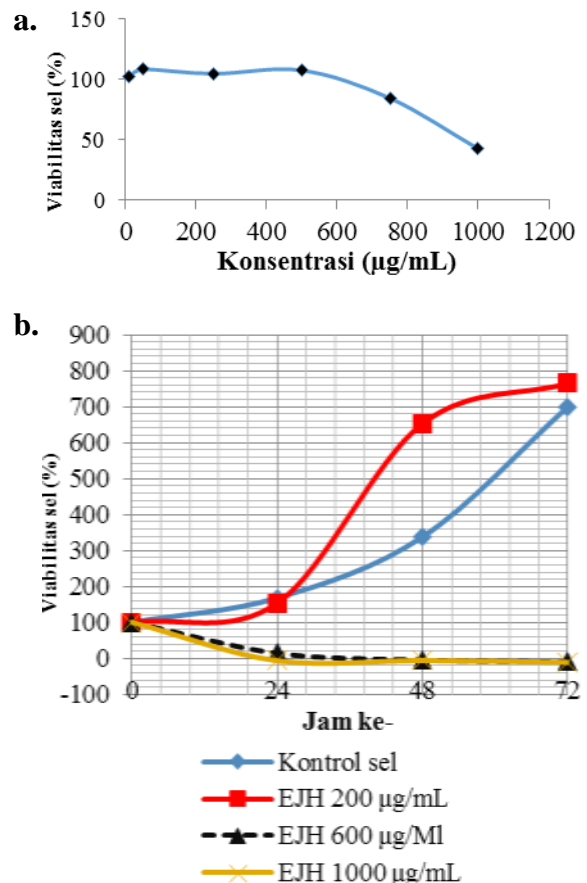
Ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas estrogenik. Uji sitotoksik dan proliferasi sel menggunakan metode MTT dan uji pengamatan ekspresi protein dengan menggunakan metode *Western blot*. Bobot

yang ditimbang untuk setiap uji adalah 5 mg.

Sebelum melakukan uji proliferasi, dilakukan terlebih dahulu uji sitotoksik untuk mengetahui profil umum sitotoksitas EJH terhadap sel CHO-K1. Baik uji sitotoksik maupun uji proliferasi dilakukan dengan metode MTT dengan membedakan jumlah sel yang ditanam sebagaimana dijelaskan pada bagian metode. Dari profil uji sitotoksik dapat ditentukan konsentrasi yang representatif untuk uji proliferasi. Dengan kata lain, uji sitotoksik dilakukan sebagai uji pendahuluan proliferasi.

Fenomena proliferasi ditunjukkan dengan kurva viabilitas sel (%) yang mengalami kenaikan, sebaliknya penurunan kurva menggambarkan fenomena sitotoksik (Gambar 2).

**Gambar 2.** Efek EJH terhadap proliferasi sel CHO-K1. Profil sitotoksik (a) dan proliferasi (b) EJH dengan MTT Assay pada sel CHO-K1. Profil menunjukkan peningkatan proliferasi sel pada konsentrasi 200-800 µg/mL.



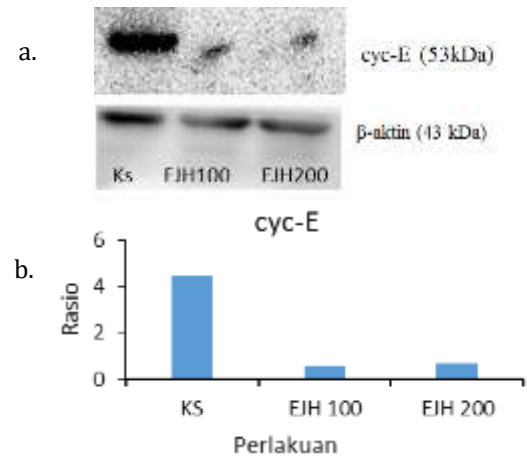
Pada kurva terlihat fenomena kenaikan terjadi pada titik pertama menuju ke titik kedua. Kedua titik ini di bawah konsentrasi 200 µg/mL. Sementara titik-titik lainnya memperlihatkan kecenderungan penurunan. Dengan demikian, berdasarkan profil sitotoksik tersebut dapat diprediksi bahwa fenomena proliferasi terjadi pada konsentrasi di bawah 200 µg/mL (Gambar 2a).

Selanjutnya untuk uji proliferasi dipilih tiga konsentrasi, yakni 200, 600, dan 1000 µg/mL. Pertimbangan pemilihan ketiga konsentrasi tersebut didasarkan karena pada grafik sitotoksitas, konsentrasi 200 µg/mL menunjukkan kecenderungan proliferasi, konsentrasi 600 µg/mL merupakan titik mula terjadinya sitotoksik, dan 1000 µg/mL adalah konsentrasi tertinggi. Sehingga diharapkan ketiga konsentrasi tersebut akan memberikan hasil uji yang representatif.

Hasil uji sitotoksik dengan hasil pengamatan proliferasi menunjukkan korelasi yang sesuai. Hasil uji proliferasi menunjukkan bahwa fenomena proliferasi sel CHO-K1 akibat pemberian EJH terjadi pada konsentrasi 200 µg/mL yang ditunjukkan dengan kurva berwarna merah (Gambar 2b). Hal ini sesuai dengan grafik sitotoksik yang memperlihatkan kenaikan viabilitas pada konsentrasi di bawah 200 µg/mL, dimana kenaikan viabilitas ini diprediksi sebagai fenomena proliferasi. Untuk mengonfirmasi fenomena ini perlu dilakukan uji pengamatan ekspresi protein penanda proliferasi.

Fenomena proliferasi berkaitan dengan modulasi siklus sel. Dalam pengamatan ini, digunakan antibodi cyc-E yang berperan dalam transisi dari fase G<sub>1</sub> (*gap* 1) menuju S (sintesis) dalam siklus sel. Ekspresi cyc-E yang tinggi dapat memicu terjadinya proses sintesis DNA. Proses sintesis DNA yang terus menerus dapat menyebabkan sel mengalami proliferasi. Selain itu, digunakan pula beta aktin sebagai

protein *housekeeping* yang diekspresikan oleh semua sel pada umumnya sehingga dijadikan sebagai pembanding. Hasil pengamatan dari metode ini berupa pita intensitas cyc-E dan beta aktin, untuk selanjutnya dikuantifikasi menjadi persen intensitas pita cyc-E yang dinormalisasikan dengan beta aktin.



**Gambar 3. Efek EJH terhadap modulasi ekspresi protein proliferasi.** (a) Profil pita ekspresi protein cyc-E dan β-aktin. (b) Kuantifikasi intensitas pita. Pengamatan ekspresi protein cyc-E dan β-aktin dilakukan menggunakan metode *Western Blot* dan dianalisis menggunakan *ImageJ*.

Dari grafik diketahui bahwa intensitas cyc-E yang dinormalisasi dengan beta aktin pada perlakuan EJH konsentrasi 100 µg/mL dan 200 µg/mL mengalami penurunan dibanding dengan kontrol sel (Gambar 3). Hal ini menunjukkan fenomena proliferasi berdasarkan hasil uji sitotoksik dan proliferasi sebelumnya tidak diperantarai oleh regulasi Cyclin E dan dimungkinkan melalui mekanisme lain. Selanjutnya, interaksi molekuler yang terjadi antara senyawa dengan protein penanda proliferasi penting dilakukan untuk mengetahui kemungkinan kejadiannya melalui studi *in silico*.

*Molecular docking* dilakukan pada senyawa uji dan ligan natif terhadap protein penanda proliferasi yang lain, yakni ER-α. Dalam metode ini, digunakan senyawa uji



timokuinon sebagai model yang representatif dari ekstrak jinten hitam. Sebagaimana yang dilaporkan Ekowati *et al.*, (2011) bahwa timokuinon merupakan salah satu senyawa esensial yang terkandung dalam biji jinten hitam (*N. sativa* L.). Skor dan visualisasi *docking* timokuinon, dan ligan natif terhadap ER- $\alpha$  berturut-turut dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 4.

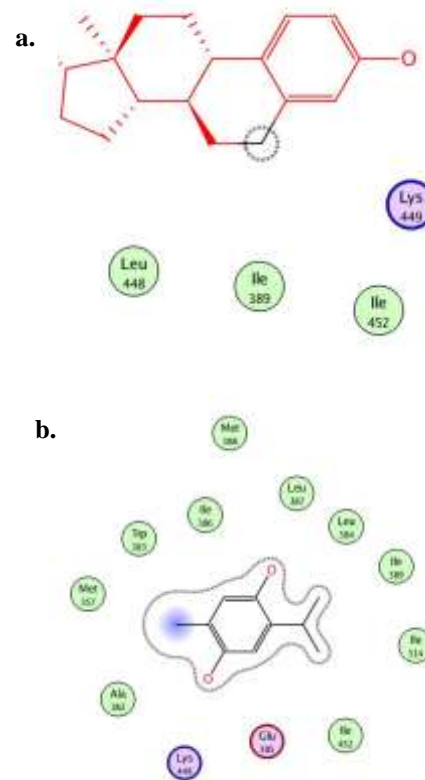
**Tabel I. Skor *docking* timokuinon, dan ligan natif terhadap ER- $\alpha$**

Ligan	Skor <i>docking</i>
	(kcal/mol)
	ER- $\alpha$
Native 1ERE	-90,0808
Timokuinon	-58,876
RMSD	0,5602

Berdasarkan *molecular docking*, didapatkan interaksi timokuinon terhadap ER- $\alpha$  tidak lebih stabil dibanding ligan natif karena nilainya yang lebih tinggi. Akan tetapi, secara pengamatan visualisasi terlihat adanya lingkungan berupa residu asam amino yang terikat menunjukkan adanya lingkungan protein Lys 449, Ile 389, Ile 452 yang sama antara timokuinon dengan ligan natif pada ER- $\alpha$ . Hal ini menunjukkan kemungkinan ikatan antara timokuinon dengan protein penanda proliferasi dapat terjadi (Gambar 4).

Posisi penelitian ini sebagai sumber informasi terkait penelusuran potensi estrogenik tumbuhan jinten hitam, dengan melakukan pendekatan yang berbeda dari penelitian terdahulu, yakni secara *in vitro* dan *in silico*. Penelitian *Nigella sativa* terhadap efek estrogenik sebelumnya dilakukan secara *in vivo* pada tikus yang terovariektomi sebagai model wanita menopause menunjukkan bahwa *Nigella sativa* meningkatkan efek estrogenik ditunjukkan melalui uji uterotrofik dan sel vagina cornifikasi serta kadar estrogen darah (Parhizkar *et al.*, 2011). Penelitian *in vitro* dan *in silico* ini melengkapi data

aktivitas estrogenik *Nigella sativa* ditinjau dari nilai IC<sub>50</sub>, viabilitas sel proliferasi, dan protein penanda proliferasi.



**Gambar 4. Visualisasi *docking* ligan natif (a) dan timokuinon (b) terhadap ER- $\alpha$ .** Visualisasi dilakukan dengan software YASARA. Adanya kemiripan komposisi residu-residu asam amino dari interaksi antara ligan natif dan timokuinon dengan ER- $\alpha$  menunjukkan kemiripan lingkungan tempat berikatan. Tanda kotak menunjukkan residu asam amino yang sama.

Data-data yang diperoleh telah memenuhi syarat validitas dari segi metode dan teknis penelitian serta penyajian. Terlihat keterbaruan dalam pemilihan metode sehingga diperoleh temuan bahwa fenomena proliferasi berdasarkan hasil uji sitotoksik EJH dan proliferasi sebelumnya tidak diperantarai oleh regulasi Cyclin E. Penelitian ini juga menyertakan profil menunjukkan efek bifasik, sebagaimana terjadi pada senyawa estrogenik lainnya, seperti genistein, kurkumin, dan brazilin, sehingga menguatkan karakteristik fitoestrogenik jinten hitam.

## KESIMPULAN

Ekstrak jinten hitam (EJH) pada konsentrasi 200 µg/mL meningkatkan proliferasi sel CHO-K1 dan dapat menurunkan ekspresi protein Cyclin E pada sel CHO-K1. Timokuinon sebagai model yang merepresentasikan salah satu senyawa yang terkandung dalam ekstrak jinten hitam dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen secara molekuler.

Untuk pengembangan selanjutnya, perlu dilakukan standarisasi sampel sehingga dapat diketahui kandungan senyawa aktif dalam EJH yang memang berperan sebagai fitoestrogen. Selain itu, perlu dilakukan penelusuran lebih lanjut mengenai mekanisme modulasi hormon estrogen seperti protein-protein yang berperan di dalamnya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Kami berterimakasih kepada Dirjen Pendidikan Tinggi (DIKTI), Kementerian Pendidikan, Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini pada tahun 2017.

## DAFTAR PUSTAKA

- Berry SDK., Jobst PM., Ellis SE., Howard RD., Capuco AV., and Akers RM. 2003. Mammary Epithelial Proliferation and Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression in Prepubertal Heifers : Effect of Ovariectomy and Growth Hormone. *Journal of Dairy Science*. **86** (6): 2098-2105.
- Ekowati H, Prasasti E, Rastuti U. The active fraction from *Nigella sativa* and its activity againsts T47D cell line. *Indonesian Journal of Chemistry*. **11**(3): 217-22.
- Hertiani, T., 2007, *Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Indonesian Marine Sponges*, Dissertation, Heinrich-Heine Universitat, Dusseldorf.
- Jefferson, W.N., Couse, J.F., Padilla-Banks, E., Korach, K.S. and Newbold, R.R., 2002. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)  $\alpha$  expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER $\beta$ -mediated and nonestrogenic actions. *Biology of reproduction*, **67**(4): 1285-1296.
- Kenny, A.M. and Prestwood, K.M. 2000. Osteoporosis : pathogenesis, diagnosis, and treatment in older adults. *Rheumatic disease clinics of North America*. **26**(3): 569-591
- O'Lone, R., Martin C. Frith, Elinor K. Karlsson, Ulla Hansen; Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. *Mol Endocrinol* 2004; **18** (8): 1859-1875. doi: 10.1210/me.2003-0044
- Parhizkar, S., Latiff LA, Rahman SA, Dollah MA. 2001. Preventive effect of *Nigella sativa* on metabolic syndrome in menopause induced rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**(8):1478-1484.
- Parhizkar S, Latiff LA, Parsa A. Effect of *Nigella sativa* on reproductive system in experimental menopause rat model. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **6** (1) : 95-103.