

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Kanker Kolon WiDr

Fransiscus Feby Handoko¹, Astrid Ayu Maruti², Erlina Rivanti³,
Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri⁴, dan Edy Meiyanto⁵

Abstract

¹⁻⁵Fakultas Farmasi,
Universitas Gadjah Mada,

Correspondence

Prof.Dr.Edy Meiyanto,
MSi,Apt. ,Fakultas Farmasi,
Universitas Gadjah Mada,
Sekip Utara II, Yogyakarta
55281. Email :
meiyan_e@ugm.ac.id

Temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) rhizome showed cytotoxic effect against T47D breast cancer cell line. It contains Panduratin, a chalcone compound, that has been investigated as chemopreventive agent. The exploration of extract of temu kunci as chemopreventive agent was expected to be an alternative for cancer therapy. The aim of this research was to determine the cytotoxic activities of ethanolic extract of temu kunci against HeLa cervix cancer and WiDr colon cancer cell line. The cytotoxic activities of ethanolic extract of temu kunci were tested using MTT assay against HeLa and WiDr cells. The IC50 values were obtained using linier regression equation. The ethanolic extract of temu kunci showed cytotoxic activities on HeLa cervix cancer and WiDr colon cancer cell lines with IC50 at 87 µg/mL and 76 µg/mL, respectively. Low IC50 values (<100 µg/mL) showed that ethanolic extract of temu kunci is potential to be developed as chemoprevention agent on cervix cancer and colon cancer. However, its molecular mechanism need to be explored.

Keyword : temu kunci rhizome (*Boesenbergia pandurata*), WiDr cell, HeLa cell, cytotoxic.

Pendahuluan

Kanker kolon dan kanker serviks merupakan jenis kanker dengan insidensi yang tinggi. Penelitian menunjukkan bahwa terdapat 108.070 kasus kanker kolon dan 11.070 kasus kanker serviks di Amerika pada tahun 2008 (Jemal *et al.*, 2008). Terdapat 49.960 kematian yang disebabkan kanker kolon dan 3.870 kematian yang disebabkan kanker serviks.

Kemoterapi merupakan salah satu langkah penyembuhan dalam kanker tetapi memiliki efek samping yang tidak menyenangkan, penyembuhan yang kurang tuntas bahkan terjadi resistensi obat. Alternatif pengobatan kanker dapat dilakukan dengan memanfaatkan senyawa yang terkandung dalam bahan alam. Oleh karena itu perlu adanya penelitian mengenai alternatif pengobatan kanker kolon dan kanker serviks yang efektif dan efisien berbasis bahan alam.

Salah satu dari bahan alam yang mempunyai aktivitas sebagai agen kemoprevensi kanker adalah temu kunci (*Boesenbergia pandurata*). Salah satu kandungan utama dalam temu kunci yang bersifat sitotoksik adalah Panduratin A. Hal ini dibuktikan dengan penelitian bahwa panduratin A yang terkandung dalam temu kunci dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF7 dan sel adenokarsinoma kolon HT-29 pada manusia melalui penghambatan COX-2 yang merupakan faktor

penting dalam perkembangan inflamasi dan sel tumor. Selain itu, panduratin A juga telah dibuktikan mempunyai aktivitas antimutagenik melalui induksi Quinon Reduktase (QR) yang merupakan enzim fase II. Enzim fase II memiliki peran penting dalam mekanisme pertahanan sel dan metabolisme, seperti detoksifikasi senyawa-senyawa elektrofilik. Sel HT-29 yang diperlakukan dengan panduratin A menunjukkan adanya gejala apoptosis, misalnya membran yang menggelembung, kondensasi kromatin, dan atau fragmentasi nukleus dan badan apoptotik ketika sel diwarnai dengan Hoechst 33258 (Kirana *et al.*, 2006). Pada penelitian lain telah dibuktikan bahwa Panduratin A yang merupakan derivat dari kalkon juga mempunyai berbagai efek biologis, seperti antiinflamasi, analgetik, dan antioksidan (Yun *et al.*, 2006). Penelitian-penelitian tersebut semakin mengarahkan rimpang temu kunci sebagai agen kemopreventif.

Melalui penelitian ini akan diketahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel kanker HeLa dan sel kanker WiDr. Selain itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam rimpang temu kunci sehingga dapat diketahui senyawa aktif yang berperan sitotoksik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan rimpang temu kunci sebagai agen kemopreventif.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi anti kanker ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada dua sel kanker yang berbeda, yaitu sel kanker serviks HeLa dan sel kanker kolon WiDr.

Metode

Bahan Penelitian

Ekstrak etanolik rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang diperoleh dengan jalan remaserasi dalam etanol 70% (Merck), rimpang temu kunci yang diperoleh dari daerah B2P2TO2T (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional). Sel kanker kolon WiDr dan kanker serviks HeLa diperoleh dari koleksi Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Prosedur Penelitian

Pembuatan ekstrak etanolik rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*)

Rimpang tanaman temu kunci diperoleh dari B2P2TO2T (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional). Pengeringan dan pembuatan serbuk rimpang dilakukan oleh B2P2TO2T. Serbuk kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70 % selama empat hari dan diremaserasi selama dua hari. Filtrat diuapkan dengan rotary vacuum evaporator.

Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak etanolik rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*)
Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak etanolik rhizoma temu kunci dilakukan secara kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel 60 GF 254. Kandungan kimia yang diperiksa diarahkan untuk identifikasi golongan chalcone. Sistem fase gerak untuk deteksi flavonoid menggunakan kloroform : etil asetat (3 : 7). Sebanyak 20 mg ekstrak dilarutkan dalam metanol p.a. kemudian totolkan pada plate KLT. Masukkan plate dalam chamber yang telah jenuh dengan fase gerak dan elusi sampai batas elusi delapan sentimeter. Kromatogram diamati secara visual dibawah sinar

tampak dan sinar UV 254 dan 366 nm untuk mengamati bercak yang timbul. Kemudian direaksikan dengan reaksi uap amonia dan juga pereaksi semprot sitroborat dan $AlCl_3$.

Kultur Sel

Sel HeLa ditumbuhkan dalam media DMEM 1640 (Gibco) yang mengandung 10 % v/v Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), penisillin 100 unit/mL-streptomisin 100 µg/mL (Gibco), dan 20% Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma). Sel WiDr ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) yang mengandung FBS 10% (v/v) (Qualified, Gibco, Invitrogen), dan antibiotika penisillin 100 unit/mL-streptomisin 100 µg/mL (Gibco, Invitrogen Corporation), Phosphate buffer Saline (PBS) dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan aliran 5% CO_2 .

Uji Sitotoksitas terhadap sel HeLa dan sel WiDr

Uji sitotoksitas menggunakan MTT assay. Sel HeLa dan sel WiDr didistribusikan ke dalam 96 well plate (Nunc) dengan jumlah 5000 sel per sumuran dan diinkubasi bersama sampel uji (ekstrak) baik aplikasi tunggal maupun kombinasi keduanya dengan menggunakan pelarut DMSO selama 24 jam pada inkubator CO_2 (Heraceus). Pada akhir inkubasi sel HeLa, ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 µL MTT (Sigma) dalam media DMEM (Gibco) untuk sel HeLa dan 100 MTT (Sigma) dalam media RPMI (Gibco) untuk sel WiDr. Kemudian, plate diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C hingga terbentuk kristal formazan (lihat di bawah mikroskop inverted (Zeiss)). Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Setelah 4 jam, reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan reagen stopper SDS 10%, 100 µL pada masing-masing sumuran, lalu diinkubasi selama semalam pada suhu kamar dengan ditutup oleh aluminium foil. Serapan dibaca dengan ELISA reader (Bio-Rad) pada panjang gelombang 595 nm.

Hasil Analisa

Uji Sitotoksitas

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan p erlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100 \%$$

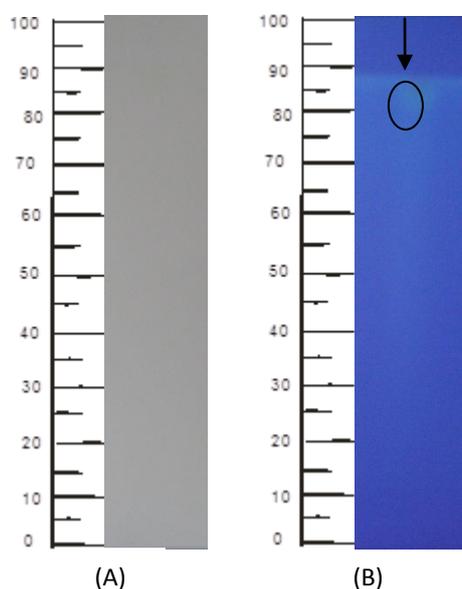
Kemudian dicari persamaan regresi linearnya dan dihitung konsentrasi IC_{50} yaitu konsentrasi yang

menyebabkan kematian 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle and Griffiths 2006).

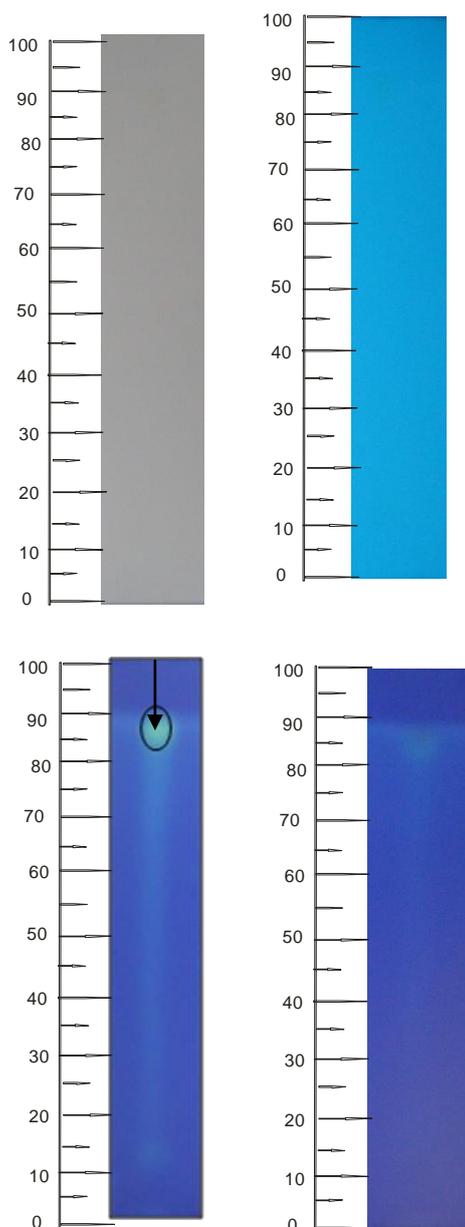
Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi dan Pemeriksaan Kandungan Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Kunci

Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Karanganyar, Jawa Tengah. Hasil ekstraksi 500 gram serbuk simplisia dengan pelarut etanol 70 % menghasilkan 95.175 gram ekstrak kental sehingga diperoleh rendemen sebesar 19 %.



Gambar 1. Pemeriksaan KLT ekstrak etanolik temu kunci dengan pereaksi semprot amonia menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid. Ekstrak etanolik rimpang temu kunci dielusi dengan menggunakan dengan fase diam selulosa dan fase gerak kloroform : etil asetat (3 : 7) dan divisualisasi menggunakan pereaksi semprot amonia. Pengamatan dilakukan pada (A) sinar tampak, (B) UV 365 nm setelah penyemprotan. bercak senyawa golongan flavonoid →

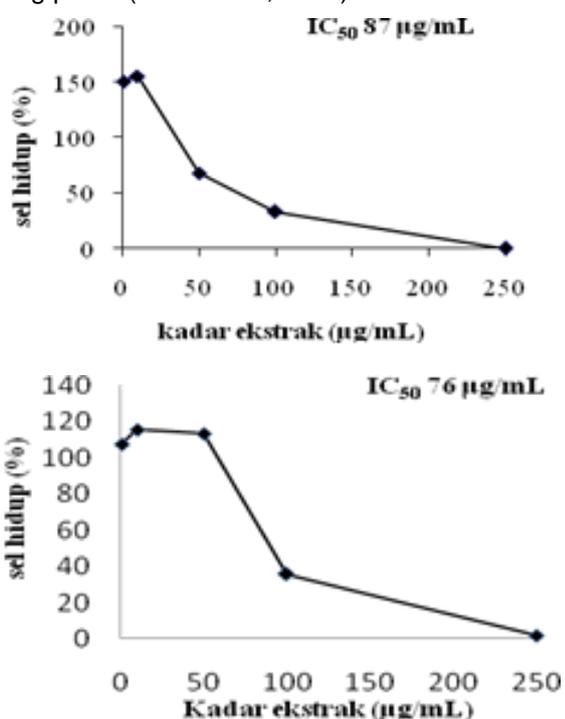


Gambar 2. Pemeriksaan KLT ekstrak etanolik rimpang temu kunci dengan pereaksi semprot sitroborat dan AICI₃ menunjukkan adanya senyawa golongan chalcone. Ekstrak etanolik rimpang temu kunci dielusi dengan menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak kloroform : etil asetat (3 : 7) dan divisualisasi menggunakan pereaksi semprot sitroborat dan AICI₃. Pengamatan dilakukan pada (A) Sinar tampak setelah penyemprotan UV, (B) 254 nm, (C) UV 365 nm, (D) UV 365 nm setelah penyemprotan. Bercak senyawa golongan chalcone →

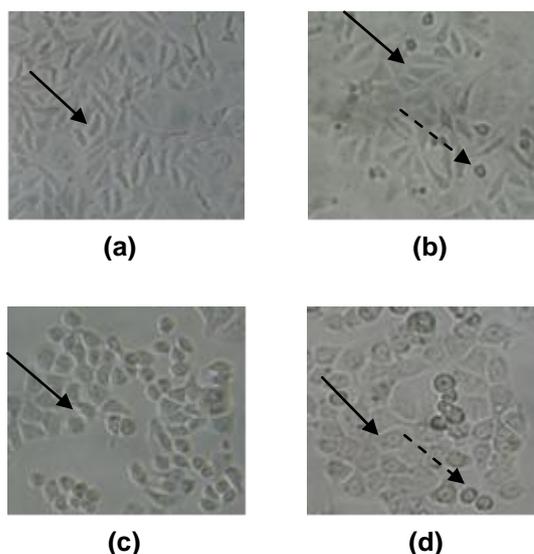
Uji Sitotoksik Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Kunci Terhadap sel HeLa dan WiDr

Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui potensi ketoksikan dari bahan uji berupa ekstrak etanolik rimpang temu kunci yang dinyatakan dalam parameter IC50. Perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci dengan seri kadar 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, dan 750 µg/ml terhadap sel HeLa menunjukkan pertumbuhan sel meningkat sampai pada konsentrasi 10 µg/ml, kemudian terjadi penurunan jumlah sel dan pada konsentrasi 250 µg/ml semua sel telah mati. Nilai IC50 perlakuan tunggal ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel HeLa diperoleh sebesar 87 µg/ml (Gambar 1A).

Pada perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci dengan seri kadar 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, dan 750 µg/ml terhadap sel WiDr menunjukkan pertumbuhan sel meningkat sampai pada konsentrasi 10 µg/ml, kemudian terjadi penurunan jumlah sel dan pada konsentrasi 500 µg/ml semua sel telah mati. Nilai IC50 perlakuan tunggal ekstrak etanolik rimpang temu kunci diperoleh sebesar 76 µg/ml (Gambar 1B). Kedua nilai tersebut menunjukkan efek sitotoksik yang poten (Ueda et al., 2002).



Gambar 3. Efek perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci (TK) terhadap pertumbuhan sel HeLa dan sel WiDr. Sel HeLa dan sel WiDr diinkubasi sebanyak 5000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran, kemudian diberi (A) Perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel HeLa (1-750 µg/mL), (B) Perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel WiDr (1-750 µg/mL).



Gambar 4. Efek perlakuan tunggal ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada morfologi sel HeLa dan sel WiDr. Masing-masing sel diinkubasi sebanyak 5000 sel/sumuran dalam plate 96 sumuran (A) kontrol sel HeLa, (B) sel HeLa setelah perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci konsentrasi 100 µg/ml, (C) kontrol sel WiDr, (D) sel WiDr setelah perlakuan ekstrak etanolik rimpang temu kunci konsentrasi 100 µg/ml.

Sel hidup ———▶ sel yang telah berubah morfologi (sel mati) - - - -▶

Pembahasan

Melalui hasil penelitian ini, dapat dikaji diketahui pengaruh pemberian ekstrak etanolik rimpang temu kunci terhadap pertumbuhan sel HeLa dan sel WiDr. Untuk mengetahui kandungan senyawa dalam rimpang temu kunci dilakukan pemeriksaan senyawa dengan metode KLT. Hasil KLT dengan penyemprotan uap amonia pada sinar tampak, ketiga totalan dari ekstrak rimpang temu kunci tidak memberikan bercak yang dapat teramati pada sinar tampak. Namun pada pengamatan di bawah UV 366 ekstrak temu kunci memberikan fluoresens lemah berwarna kuning. Berdasarkan literatur, senyawa flavonoid chalcone memberikan warna hijau dan kuning cerah pada sinar tampak dan pada UV 254 terjadi pemadaman (Harborne, 1987). Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam ekstrak etanolik rimpang temu kunci terkandung senyawa chalcone.

Tahap deteksi selanjutnya dilakukan menggunakan pereaksi semprot sitroborat dan AICI₃ dikarenakan deteksi uap amonia hanya bersifat sementara. Hasil dari KLT dengan penyemprotan sitroborat dan AICI₃ terlihat bahwa pada sinar tampak, bercak tidak teramati, dan pada sinar UV

254 nm memberikan pemadaman. Sedangkan pada UV 366 secara keseluruhan bercak memberikan fluoresensi berwarna kuning kehijauan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa dalam ekstrak uji terdapat senyawa chalcone.

Hasil sitotoksik aplikasi tunggal penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik rimpang temu kunci mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa dan sel WiDr. Uji sitotoksik tunggal ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel HeLa dan sel WiDr menghasilkan IC50 yang rendah yaitu sebesar 87 µg/mL sebesar 76 µg/mL. Pertumbuhan sel sangat dipengaruhi oleh mekanisme regulasi siklus sel. Penghambatan pertumbuhan sel dapat terjadi melalui deregulasi siklus sel yang dapat disebabkan oleh berbagai mekanisme.

Sel HeLa diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. E6 berikatan dengan p53 yang terfosforilasi sedangkan E7 berikatan dengan protein pRb. Ikatan E7 dengan pRb akan menyebabkan pRb terfosforilasi dan mengakibatkan lepasnya E2F yang menginduksi gen-gen esensial untuk proses sintesis dan mitosis, akibatnya sel memasuki proses cell cycle (DeFillippis *et al.*, 2003). Panduratin A yang merupakan golongan chalcone, pada sel CaP, menunjukkan aktivitas penurunan level protein cyclin D1 dan cyclin E. Penggunaan panduratin A juga menurunkan regulasi CDK2, CDK4, dan CDK6 (Yun *et al.*, 2006). Penurunan kompleks cyclin-CDK dapat menghambat fosforilasi pRb sehingga E2F tidak aktif sebagai faktor transkripsi. Pada ekstrak etanolik rimpang temu kunci mengandung senyawa-senyawa chalcone, sehingga aktivitas sitotoksik dari temu kunci pada sel HeLa kemungkinan terjadi melalui penurunan level kompleks cyclin-CDK yang menyebabkan pRb tidak terfosforilasi. Hambatan terhadap fosforilasi pRb yang tidak terfosforilasi menyebabkan E2F menjadi tidak aktif sebagai faktor transkripsi dan menyebabkan cell cycle arrest.

Gen p53 pada sel WiDr telah mengalami mutasi (Noguchi *et al.*, 1976). Mutasi pada gen p53 menyebabkan ekspresi protein Cip/Kip yang berperan dalam kontrol daur sel dan apoptosis menjadi berkurang. Panduratin A diketahui dapat meningkatkan regulasi p27Kip1 dan p21WAF/Cip1 (3). Sehingga mekanisme yang terjadi pada uji sitotoksik ekstrak etanolik temu kunci pada sel WiDr kemungkinan melalui peningkatan regulasi p27Kip1 dan p21WAF/Cip1 sehingga cell cycle arrest atau apoptosis dapat terjadi.

Data yang dihasilkan melalui penelitian ini dapat menunjukkan aktivitas sitotoksik dari rimpang temu kunci. Hal ini juga menambah data agen kemopreventif dari bahan alam yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Perlu

adanya penelitian lebih lanjut untuk menjelaskan mekanisme yang memperantarai aktivitas sitotoksik dari rimpang temu kunci terhadap sel HeLa dan sel WiDr.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa ekstrak etanolik rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) memiliki kandungan senyawa chalcone dan berpotensi sebagai agen kemopreventif sel kanker serviks HeLa dan sel kanker kolon WiDr.

Daftar Pustaka

- DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., and DiMaio, D., 2003, Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in Hela Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology*; 77(2):1551-1563.
- Doyle, A. and Griffiths, J.B., 2006, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. Chichester: Wiley.
- Harborne, J.B. 1987, *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB; hlm 69-73.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J., 2008, Cancer statistics, *Cancer J. Clin.*; 56(2):106-130.
- Kirana, C., Jones, G.P., Record, I.R., and McIntosh, G.H., 2006, Anticancer Properties of Panduratin A Isolated from *Boesenbergia Pandurata* (Zingiberaceae), *Journal of Natural Medicine*; 61:131-137.
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Early, E.M., O'Brien, S. and Ferrone, S., 1979, Characterization of the WiDr: a Human Colon Carcinoma Cell Line. *In Vitro*; 15(6):401-408.