

Analisa Sitotoksitas α -Mangostin Terhadap Sel Hapatoma (HepG2 Cells)

Harliansyah^{1*}, Aan Royhan², Ikke Irmawati PA³

1) Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta

2) Bagian Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta

3) Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta

*Korespondensi : Email: harliansyah.hanif@yarsi.ac.id / ianshr2001@yahoo.com

Abstrak

Buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) telah lama dikenal sebagai buah-buahan tropik yang terasa manis dan banyak digemari masyarakat di negara Asia Tenggara. Umumnya, masyarakat mengkonsumsi buah manggis dan membuang kulit buahnya. Namun kulit buah tersebut mengandung khasiat untuk pengobatan diare, disentri, eksim dan penyakit gatal-gatal pada kulit. Kulit buah manggis mengandung senyawa xanthon dengan senyawa aktif mangostin. Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas α -mangostin dari berbagai konsentrasi terhadap sel kanker hati, HepG2 dan juga analisis *reactive oxygen species* (ROS). Analisis sitotoksik terhadap sel HepG2 menunjukkan pada konsentrasi α -mangostin 242,58 $\mu\text{g/ml}$ mampu menghambat 50% (IC_{50}). Selanjutnya α -mangostin pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ mampu menghambat tingkat pembentukan ROS sebesar $23,15 \pm 4,29\%$. Hasil penelitian ini menunjukkan α -mangostin bersifat sitotoksik dan dapat menghambat pembentukan radikal bebas (ROS) .

Kata kunci: mangostin, sitotoksik, radikal bebas, sel kanker, sel HepG2

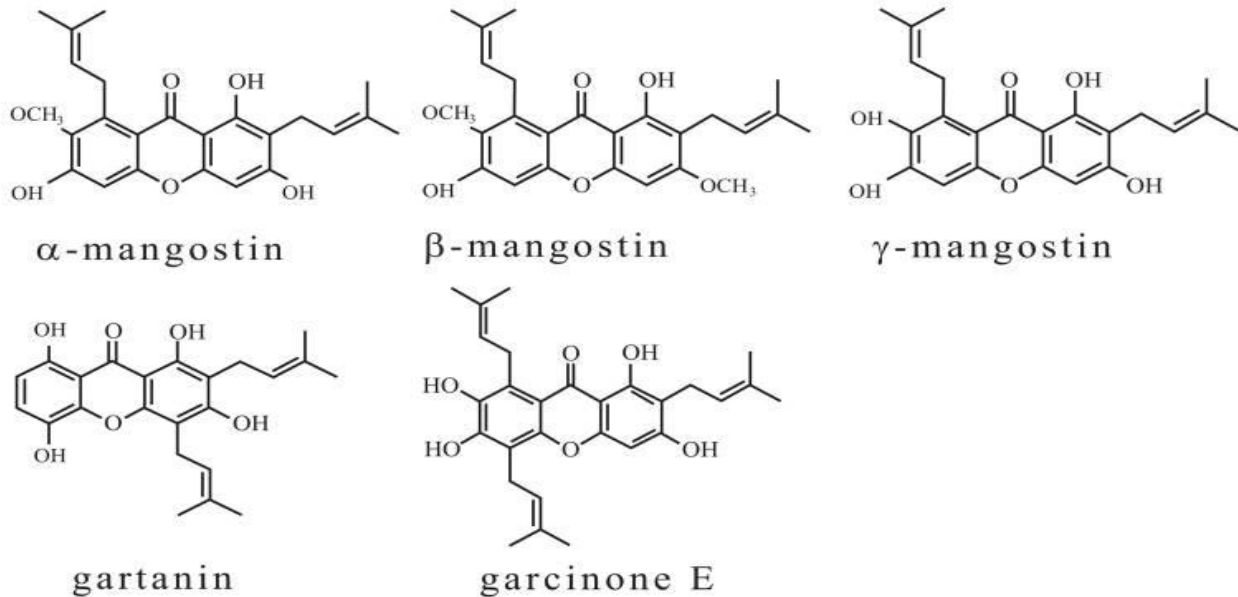
Pendahuluan

Penelitian terhadap kanker saat ini lebih diarahkan kepada target molekular yang melibatkan bahan tumbuhan alami sebagai kemopreventif untuk mengurangi resiko berlakunya karsinogenesis. Mekanisme kemopreventif bertujuan menekan tingkat proliferasi sel kanker, menghambat daur signaling faktor pertumbuhan, menginduksi apoptosis, menghambat faktor-faktor transkripsi (AP-1, NF κ B, p53, JAK-STAT), menghambat angiogenesis, menghambat pengekspresian protein-protein anti-apoptosis serta menghambat siklooksigenase (Aggarwal dan Shishodia, 2006). Kajian mekanisme penghambatan sel kanker sering pula dikaitkan dengan sifat antioksidan dan anti inflamasi yang terkandung dari zat aktif bahan alami tadi (Farinati *et al.* 2001, Yin *et al.* 2005 dan Issa *et al.* 2006).

Secara terminologi istilah sitostatik dimaksudkan bukan untuk membunuh sel kanker, melainkan untuk menghentikan kegiatan sel dari proliferasi. Zat sitostatik akan menghambat pertumbuhan sel kanker serta

mencegah perkembangan metastasis tanpa mengkerutkan tumor. Sifat sitostatik akan dihasilkan selama penyakit itu stabil, ketersediaan zat pengubah selama pengujian aktivitas klinik. Adapun kerusakan DNA yang mengarah kepada proses kematian sel secara terencana (apoptosis) merupakan mekanisme awal sitotoksik dari berbagai jenis zat anti kanker (Rixe and Fojo, 2007).

Buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) familia Guttiferae, merupakan salah satu buah-buahan yang banyak tumbuh di Asia Tenggara. Daging buahnya lunak, berwarna putih serta mengandung kadar gula yang tinggi dan rendah protein. Minyak dari biji manggis mengandung asam lemak esensial seperti linoleat (1,3%), palmitat (49,5 %) dan oleat (34 %). Selain itu ekstrak kulit manggis dapat dijadikan sebagai ramuan obat tradisional sebagai anti inflamasi, anti bakterial, anti tumor serta anti oksidan. Pengujian ekstrak etanol kulit manggis terhadap sel selanjut adenokarsinoma payudara, SKBR3 menunjukkan sebagai anti proliferasi (Ajayi *et al.* 2007).



Gambar 1. Senyawa bioaktif golongan xanthon dari *Garcinia mangostana* Linn

Senyawa α -mangostin merupakan kelompok xanthon dan bersifat sitotoksik serta menghambat akumulasi lipid selama diferensiasi sel preadiposit 3T3-L1. Secara farmakologi, kulit manggis berkhasiat sebagai antioksidan serta menginduksi apoptosis melalui peningkatan permeabilitas membran, pembentukan kondensat kromatin, penurunan potensial membran mitokondria (Quan et al, 2012). Sifat anti proliferasi dari senyawa α -mangostin ditunjukkan terhadap sel DLD-1 melalui ekspresi siklin, cdc2 dan p27 (Akao et al, 2008).

Alat dan Bahan

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium yang dilakukan secara *in vitro*. Sampel yang dipakai adalah α -mangostin (Chromadex). Persiapan dan penyimpanan sampel menggunakan peralatan seperti; Laboratory Freezer (-20^oCelcius), Magnetic stirrer with Hot plate, Micro centrifuge 1.5 mL, Plate shaker thermostats, Refrigerated centrifuge 50 mL dan pH meter.

Pelaksanaan kultur sel dilakukan dalam suasana steril menggunakan alat-alat seperti; Autoclave, Biosafety cabinet, Cell Culture

Incubator CO₂, Expert Plus UV Microplate reader, Inverted Microscope Axiovert 40 CFL, Cell Culture Dish sterile, 96-Well Culture Plate sterile, Conical Centrifuge Tube 15 mL dan 50 mL, Tissue Culture Flask with Plugged Cap, 25 cm² dan 175 cm². Seperangkat Micro Pipette (Clever). Pipet Serology 10 mL (Nunc) serta Multi Channel Pipete (Omnipette) 1000 – 5000 μ L.

Metode Penelitian

Kultur Sel dan Uji Sitotoksik

Sel selanjat HepG2 (ATCC.HB-8065) ditumbuhkan di dalam media *Eagle's minimum essential medium* (EMEM) dengan suspensi 10% foetal bovine serum dan 1% penisilin-streptomisin. Sel dikulturkan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂. Setelah sel mengalami konfluen 70% sel dipanen untuk selanjutnya digantikan media yang mengandung sampel α -mangostin. Selanjutnya sel dihitung menggunakan mikroskop inverted dengan pewarna metilen biru. Analisis sitotoksik sampel α -mangostin terhadap sel HepG

dilakukan melalui perhitungan konsentrasi 50% penghambatan sel (IC₅₀) dari triplikasi perulangan (Akao *et al*, 2008)..

Deteksi Cellular Reactive Oxygen Species

Pemeriksaan aktivitas spesi oksigen reaktif (ROS) selular dilakukan secara ELISA mengikuti petunjuk kit DCFDA- Cellular Reactive Oxygen Species – ab 113851 abcam Mito Sciences. Setelah pereaksi 2,7 diklorofluoresen diasetat (DCFDA) terdifusi ke dalam sel maka DCFDA akan terdeasetilasi oleh enzim esterase selular sehingga menjadi senyawa tidak terfluoresensi yang segera teroksidasi oleh ROS dari sel menjadi senyawa 2,7 diklorofluoresen (DCF) yang terdeteksi pada spektroskopi fluoresen pada panjang gelombang eksitasi 495 nm/ emisi 529 nm (Yin *et al*. 2005).

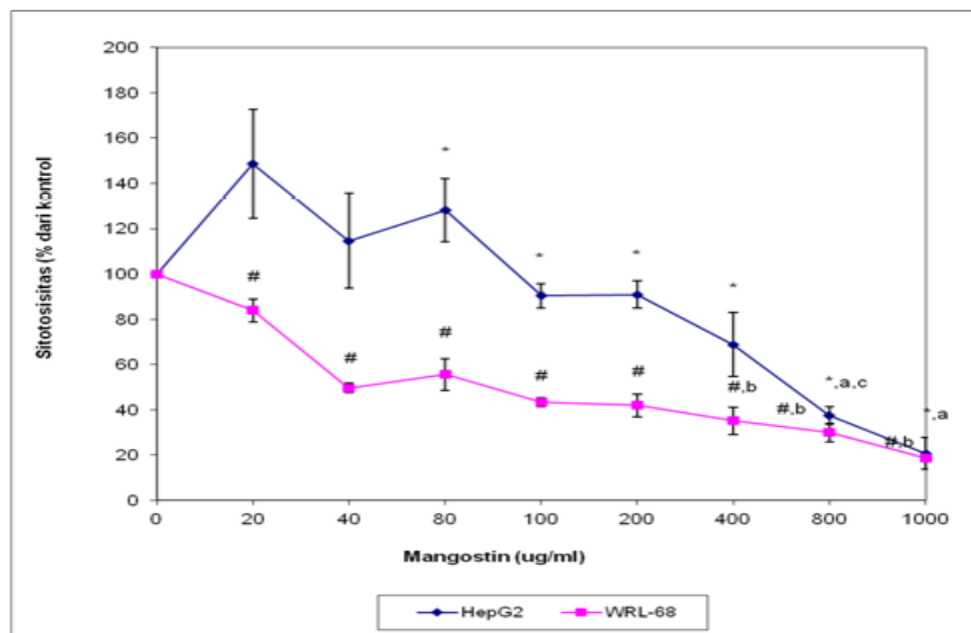
Analisa Statistik

Hasil-hasil kajian yang diperoleh dinyatakan sebagai mean \pm deviasi standard dari tiga kali eksperimen di mana tiap eksperimen dilakukan dengan tiga kali perlakuan. Pengolahan data statistik dilakukan secara Student t test dengan derajat ketangguhan $p < 0,05$.

Hasil Penelitian

Uji Sitotoksitas α -Mangostin Terhadap Sel Kanker HepG2

Hasil penelitian terlihat pada Gambar 2, dimana data yang disajikan merupakan nilai purata \pm standar deviasi dari tiga kali pengerjaan yang berbeda di mana masing-masing pengerjaan dilakukan dengan tiga perulangan. Tanda (*) menunjukkan perbandingan kontrol terhadap pengujian mangostin dari berbagai konsentrasi (* $p < 0,05$) pada sel HepG2. Tanda (#) menunjukkan perbandingan kontrol terhadap pengujian α -mangostin dari berbagai konsentrasi (* $p < 0,05$) pada sel hepatosit normal (WRL-68). Nilai IC₅₀ untuk sel HepG2 adalah 242,5837 ug/ml. Adapun terhadap sel hepatosit normal (WRL-68) adalah 285,2718 ug/ml. Dengan memperhatikan nilai IC₅₀ tersebut, jelas terlihat bahwa α -mangostin lebih bersifat toksik terhadap sel kanker hati, HepG2 dibandingkan terhadap sel hati normal, WRL-68. Hal ini di duga karena di dalam sel kanker hati lebih banyak mengandung oksidatif stres dibandingkan yang terdapat di dalam sel hati normal. Pemberian α -mangostin lebih bersifat antioksidan sehingga mampu menghambat mekanisme pembentukan radikal bebas.

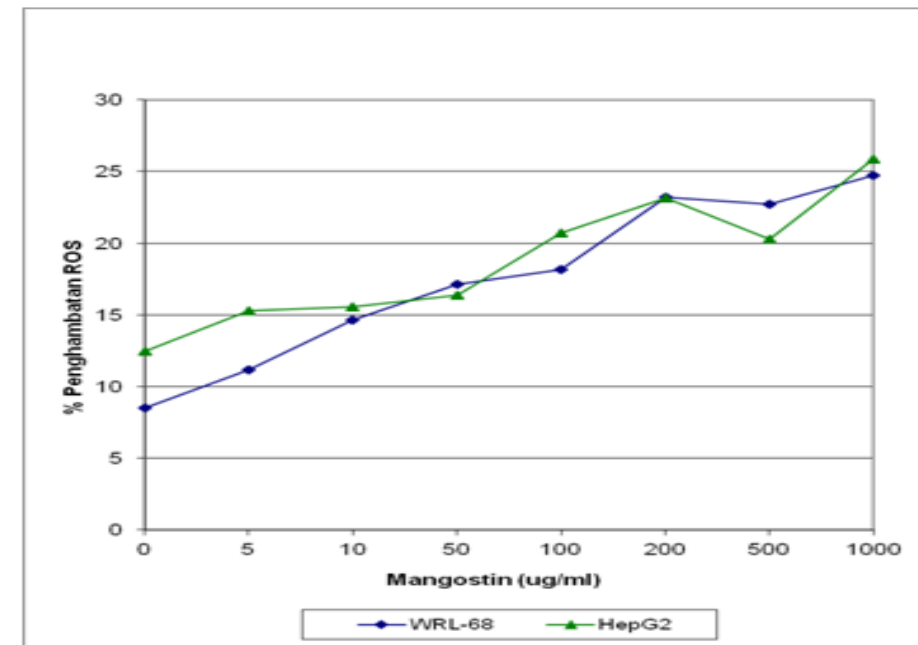


Gambar 2. Efek α -Mangostin Terhadap Sitotoksitas Sel Kanker HepG2

Analisis Cellular Reactive Oxygen Species

Adapun data yang ditunjukkan pada gambar 3 menunjukkan bahwa α -mangostin berkemampuan dalam menghambat pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

pada sel Kanker (HepG2). Konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ α -mangostin (konsentrasi mendekati nilai IC_{50} pada uji sitotoksik) mampu menghambat pembentukan ROS pada sel kanker, HepG2 adalah $23,15 \pm 4,3 \%$ berbanding sel hepatosit normal WRL-68 sebesar $23,2 \pm 2,1$.



Gambar 3. Efek α -mangostin Terhadap Penghambatan ROS Pada Sel Kanker HepG2

Diskusi

Sel sel yang mengalami proses apoptosis dapat ditandai dengan perubahan inti sel secara terfragmentasi menjadi badan apoptotik akibat proses fagositosis sel-sel tetangga. Bagian 3'-OH utas DNA akan terputus-putus dengan pemberian *bromo deoxyuridine triphosphate* (Br-dUTP) yang dikatalisa enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT). pengkerutan, kondensasi inti, fragmentasi DNA serta pembentukan badan apoptotik. Kemampuan sitotoksik maupun penginduksian apoptosis oleh suatu senyawa sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi senyawa tersebut, keberadaan berbagai mikronutrien yang tersedia, tipe sel serta keadaan redoks yang terjadi di dalam sel (Rixe *et al*, 2007).

Melalui analisa sitotoksisitas di atas dapat diketahui integritas mitokondria sel, di mana metilen biru akan direduksi oleh enzim dehidrogenase selama metabolisme sel. Semakin cepat hilangnya warna biru menunjukkan semakin besar kemampuan sel untuk bermetabolisme. Adanya α -mangostin yang diberikan ke dalam medium pertumbuhan sel turut berpengaruh dalam proses reduksi metilen biru tersebut. Dalam hal ini secara proporsional akan sebanding dengan jumlah sel yang masih hidup. Oleh karena itu uji sitotoksisitas sel dapat menunjukkan kesehatan sel di dalam sampel (Akao *et al*, 2008). Sifat antioksidan yang terkandung di dalam α -mangostin dapat menggagalkan reaksi radikal bebas melalui tiga mekanisme yaitu (1) netralisasi oleh enzim antioksidan; (2) pemutusan rantai awal oleh

antioksidan bukan enzim dan (3) penghentian rantai melalui pengikatan ion-ion logam transisi (Cu^{2+} , Fe^{2+}) oleh protein plasma (Aggarwal et al, 2006). Berdasarkan sifat antioksidan yang dimiliki α -mangostin dapat pula digunakan sebagai senyawa anti kanker untuk menghambat pertumbuhan sel. Hal ini karena sel kanker memiliki tekanan oksidatif yang tinggi. Oleh karena itu pemberian antioksidan ke dalam kehidupan sel kanker dapat menurunkan kerusakan oksidatif yang ada. Aktivitas antioksidan dari α -mangostin dapat juga digunakan sebagai bahan penginduksi apoptosis. Selain itu antioksidan yang terkandung ini juga mampu meregulasi molekul signal transduksi seperti Bax, Caspase 8, Caspase 3, faktor transkripsi $\text{Nf}\kappa\beta$ dan molekul redoks sel seperti NADH, Glutation yang mendukung apoptosis untuk menekan laju proliferasi sel kanker (Yin *et al*, 2005).

Kesimpulan

α -Mangostin bersifat antioksidan, senyawa ini dapat mempengaruhi metabolisme sel baik laju proliferasi maupun apoptosis. Asupan α -mangostin ke dalam sel akan mempengaruhi hubungan antara nutrisi dengan keadaan gen di dalam sel, di mana gen diperlukan bagi proses absorpsi nutrisi untuk metabolisme sel, sebaliknya nutrisi juga berpengaruh terhadap ekspresi gen bagi kehidupan sel. Dari uji sitotoksitas dan uji ROS terbukti bahwa, α -mangostin menginduksi signal pro-apoptosis sehingga berpeluang digunakan sebagai bahan kemopreventif untuk mencegah pertumbuhan dan perkembangan kanker.

Daftar Pustaka

- Akao, Y., Nakagawa, Y., Linuma, M., Nozawa, Y. 2008. Anticancer Effects of Xanthones From Pericarps of Mangosteen. *Journal of Molecular Sciences*. 9: 355-370.
- Ajayi, I.A., Oderinde, R.A., Ogunkoya, B.O., Egunyomi, A., Taiwo, V.O. 2007. Chemical Analysis and Preliminary Toxicological Evaluation of *Garcinia mangostana* seeds and seed oil. *Food Chem*. 101: 999 – 1004.
- Aggarwal, B.B. & Shishodia, S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem.Pharmacol* **71**: 1397-1421.
- Farinati, F. Cardin, R. Fiorentino, M. D'Errico, A. Grigioni, W. & Cecchetto, A. 2001. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease. *J. Viral Hepatitis* **8**: 34-40.
- Issa, A.Y. Volate, S.R. & Wargovich, M.J. 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J. Food Comp. Analysis* **19**:405-419.
- Quan, X., Wang, Y., Ma, Xi., Liang, Y., Tian, W., Ma, Q., Jiang, H., Zhao, Y. 2012. α -Mangostin Induces Apoptosis and Suppresses Differentiation of 3T3-L1 Cells via Inhibiting Fatty Acid Synthase. *Plos One*. 7(3) . e33376 : 1-10.
- Rixe, O., Fojo, T. 2007. Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient?. *Clin. Cancer Res*. 13: 7280-7287.
- Yin, HQ., Kim, YH., Moon, CK. & Lee, BH. 2005. Reactive oxygen species mediated induction of apoptosis by a plant alkaloids 6-methoxy dihydrosan guanine in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol*. **70**: 242-248.