

Efek Penghambatan Gingerol Terhadap 8- Hidroksideoksiganosin (8-OHdG) Penginduksi Sel Kanker, HepG2

Harliansyah*

Abstract

^{*)}Bagian Biokimia,
Fakultas Kedokteran Universitas
Yarsi
Jalan Letjen Suprpto, Cempaka
Putih Jakarta, 10510

Correspondence

Harliansyah, PhD
Bagian Biokimia,
Fakultas Kedokteran Universitas
Yarsi
alan Letjen Suprpto, Cempaka
Putih Jakarta, 10510
Email: ianshr2001@yahoo.com

Oxidative stress can damage the function of normal cells and cause pathological conditions. One of the products of oxidative stress is the formation of compounds 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is the result of oxidation of the structure of DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes on the body's tissues. In this research note that the administration of 1000 ug / ml gingerol reduces the formation of 8-OHdG hepatoma cells (HepG2) is 81.62 ± 5.59 ng / ml versus control significantly ($p < 0.05$; $r = 0.76$). This result ensures that the antioxidant properties contained in the gingerol can inhibit the activity of free radical markers (8-OHdG) so likely as a preventative against degenerative diseases such as cancer cells.

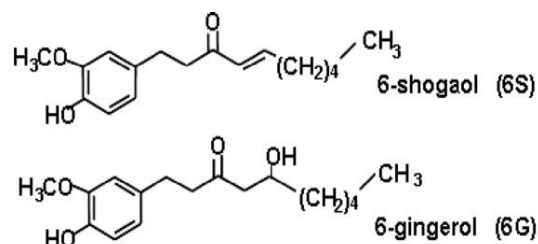
Keywords: gingerol, oxidative stress, 8-OHdG

Pendahuluan

Radikal bebas dinyatakan sebagai molekul atau spesies yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, bersifat tidak stabil, sangat reaktif serta berimplikasi terhadap signal transduksi dan ekspresi genetik. Sebagai pengoksidan dan inhibitor terhadap enzim yang mengandung ion Fe-Sulfur, radikal bebas dapat dihasilkan secara endogen maupun eksogen baik dalam keadaan normal maupun patofisiologis. Radikal bebas dapat mengoksidasi biomolekul seperti protein, lipid, DNA dan juga mengakibatkan kecederaan maupun kematian sel. Oleh karena itu, efek sitotoksik radikal bebas ini akan sangat berpengaruh terhadap keadaan patogenesis. Salah satu indikator kerusakan DNA akibat ionisasi radiasi, mutagen atau karsinogen adalah pembentukan senyawa 8-hidroksi deoksiganosin (8-OHdG) sebagai hasil oksidasi terhadap nukleosida DNA. Hinrichsen melaporkan bahwa, tikus yang diberi pakan kekurangan kolin dapat meningkatkan kadar 8-OHdG hati dan menginduksi pembentukan hepatoselular karsinoma pada tikus tersebut (Fang et al. 2002). Peningkatan kadar 8-OHdG pada urin pasien tidak hanya menjadi biomarker terhadap tekanan oksidatif selular, melainkan juga sebagai faktor resiko terhadap kanker, aterosklerosis dan diabetes. Adapun kadar normal 8-OHdG pada urin perempuan dan lelaki dewasa (20-70 tahun) adalah 138,1 dan 78,6 ng/mg kreatinin (Wu et al. 2004).

Kerusakan oksidatif DNA dapat dinyatakan sebagai kerusakan terhadap basa dan ikatan fosfodiester DNA akibat ketiadaan perbaikan dari *base excision repair* (BER) dan enzim-enzim pengubah kerusakan basa oksidatif seperti DNA glikosilase, hidroksi metil urasilglikosilase dan 8-oksoguanosin DNA glikosilase (Lunec et al. 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi gingerol di dalam penghambatan pembentukan senyawa 8-hidroksi-2'-deoksiganosin (8-OHdG) yang merupakan hasil oksidasi DNA dari sel kanker HepG2. Hasil penelitian ini akan memberikan gambaran awal bahwa gingerol mampu menghambat marker radikal bebas seperti 8-OHdG pada sel kanker sehingga dapat dijadikan sebagai bahan kemprevensi kanker lebih lanjut.



Gambar 1. Struktur Senyawa Bioaktif dari Gingerol dan Shogaol

Halia atau jahe (ginger) merupakan rhizoma dari tanaman *Zingiber officinale* Roscoe yang telah lama dikenal sebagai bahan rempah dan ramuan obat tradisional. Berbagai senyawa aktif yang dijumpai di dalam halia serta berperan penting pada kesehatan tubuh adalah gingerol dan shogaol. Senyawa gingerol yang merupakan alkanon fenolik dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2, p38 *mitogen activated protein kinase* (MAPK) dan faktor transkripsi NF κ B, sehingga tergolong sebagai senyawa yang bersifat antioksidan tinggi dan anti inflamasi (Stoilova et al. 2007). Gingerol juga diketahui dapat menginduksi *tumor necrosis factor*

related apoptosis inducing ligand (TRAIL) serta menurunkan viabilitas sel kanker gastrik dan meningkatkan ekspresi kaspase 3/7 sehingga berpeluang sebagai senyawa pro-apoptosis (Ishiguro et al. 2007).

Materi dan Metode

1. Sampel dan Kits yang Digunakan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ada senyawa [6]-gingerol yang dibeli dari Wako-Jepang dengan kode katalog no. 077-02871. Adapun analisis kuantitatif 8-OHdG dilakukan secara ELISA menggunakan Bioxytech® 8-OHdG-EIA Kit yang dibeli dari Oxis Health-USA dengan kode katalog no. 21026.

2. Kultur Sel

Sel hepatoma yang digunakan pada penelitian ini adalah sel selanjur HepG2 (ATCC, HB 8065, Rockville MD, USA) yang ditumbuhkan secara kultur sel menggunakan medium EMEM (Flow Lab, Australia) dan suplemen foetal calf serum (FCS) di dalam inkubator 37 °C, 5% CO₂. Sel yang telah mengalami kepadatan 70-80% selanjutnya disuspensi dengan campuran tripsin-EDTA dan dicuci dengan larutan bufer fosfat salin (PBS) dingin pH 7,4. Selanjutnya sel dengan kepekatan 2x10⁴ sel/ml disiapkan untuk analisa 8-OHdG.

3. Analisa 8OHdG secara ELISA

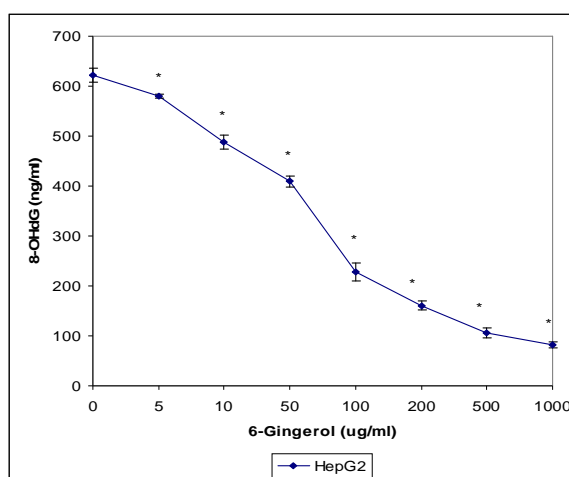
Larutan [6]-gingerol disediakan pada saat analisa dijalankan. Penyediaan larutan baku dilakukan dengan melarutkan 20 mg [6]-gingerol di dalam 2 ml DMSO 0.1% serta dilanjutkan dengan media kultur kompleks EMEM sehingga volumenya mencapai 10 ml. Beberapa seri pencairan dilakukan dengan media EMEM sehingga mendapatkan konsentrasi [6]-gingerol 5, 10, 50, 100, 200, 500 dan 1000 µg/ml.

Sebanyak 50 µl setiap seri pengenceran larutan [6]-gingerol dimasukkan ke setiap telaga (*well*) yang telah berisikan 50 µl larutan antibodi primer dan diinkubasi selama 1 jam pada temperatur 37 °C. Pipet 250 µl larutan bufer pencuci dan masukkan ke setiap telaga tadi dan lakukan pencucian sebanyak 2 kali. Selanjutnya tambahkan 100 µl larutan antibodi sekunder ke setiap telaga dan diinkubasi selama 1 jam pada temperatur 37 °C. Tambahkan 100 µl larutan kromogen ke setiap telaga dengan rata dan inkubasi kembali di dalam ruangan gelap selama 15 menit. Selanjutnya tambahkan 100 µl larutan penghenti campuran ke setiap telaga dan setelah 3 menit baca resapan larutan pada panjang gelombang 450 nm menggunakan ELISA reader.

Kadar 8-OHdG dari setiap telaga yang berisikan larutan [6]-gingerol dinyatakan melalui kurva baku larutan 8-OHdG standard.

Hasil

Esei 8-OHdG kit yang digunakan dalam kajian ini merupakan analisa kuantitatif secara *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mengetahui kadar 8-OHdG yang dihasilkan dari proses kerusakan oksidatif terhadap DNA sel. Berbagai dosis [6]-gingerol yang diperlakukan terhadap pembentukan kadar 8OHdG sel hepatoma (HepG2) dinyatakan seperti gambar 2 di bawah ini.



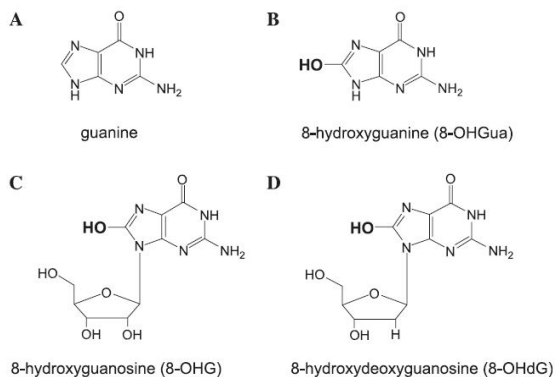
Gambar 2. Pengaruh [6]-Gingerol terhadap kadar 8-OHdG sel HepG2. Data dinyatakan sebagai Mean ± SD dengan signifikansi terhadap kontrol (*) $p < 0,05$ ($n=3$) dari eksperimen yang berbeda serta koefisien korelasi $r = 0,76$.

Pada penelitian ini jelas terlihat bahwa, kadar senyawa 8-OHdG di dalam sel HepG2 dapat menurun setelah pemberian senyawa [6]-gingerol dengan dosis 100, 200, 500 dan 1000 µg/ml masing-masing sebesar $228,78 \pm 17,97$; $160,48 \pm 8,99$; $105,61 \pm 10,22$ dan $81,62 \pm 5,59$ ng/ml signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol dengan koefisien korelasi (r) 0,76. Hal ini menunjukkan secara jelas adanya pengaruh penurunan kadar 8-OHdG sel HepG2 tersebut akibat perlakuan dengan senyawa [6]-gingerol.

Pembahasan

Kerusakan oksidatif yang permanen dapat terjadi terhadap lipid pada membran selular, protein dan DNA. Dari kerusakan DNA tersebut, maka di dalam inti sel dan mitokondria dapat dihasilkan senyawa 8-OHdG yang menjadi salah satu faktor

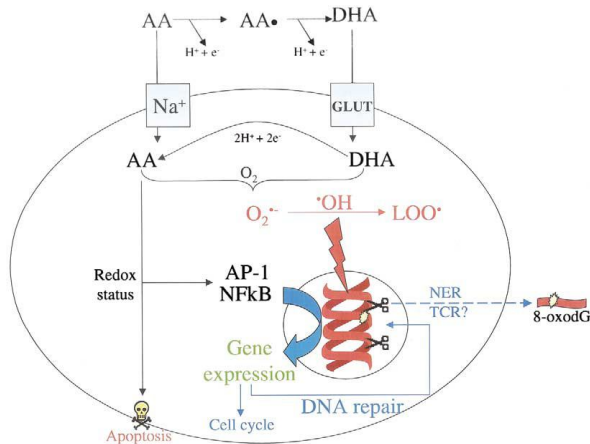
dominan pembentukan radikal bebas yang diinduksi oleh kerusakan oksidatif. Dalam hal ini senyawa 8-OHdG dianggap sebagai biomarker untuk keadaan oksidatif stres dan karsinogenesis (Valavanidis et al. 2009).



Gambar 3. Struktur kimia senyawa 8-OHdG dan analognya. A. Basa guanin. B. Oksidasi basa guanin. C. Analog senyawa 8-OHdG dari turunan RNA. D. Analog senyawa 8-OHdG dari turunan DNA. Sumber Wu et al. 2004.

Beberapa penelitian membuktikan bahwa, terdapat hubungan yang berkorelasi antara pembentukan senyawa 8-OHdG dan karsinogenesis secara *in vivo*. Oksigen yang berubah menjadi anion superoksida sebagai hasil dari pembentukan radikal bebas (ROS), telah diketahui dapat menginduksi kodon *hotspot* dari gen *p53* dan *Ha-Ras* melalui transversasi basa GC → TA di dalam sel kanker. Meningkatnya kadar 8-OHdG dan kehilangan basa di dalam sel tumor benigna, diperkirakan berhubungan juga dengan ukuran tumor di dalam sel benigna tersebut serta kemungkinan transformasi tumor benigna menjadi malignan (Olinski et al. 2002).

Selanjutnya dengan peningkatan dan modifikasi basa-basa DNA terdapat ketidakstabilan faktor genetik yang berpotensi terjadinya metastasis di dalam sel tumor. Oleh karena itu modifikasi nukleosida/basa DNA diperkirakan dapat memutuskan utas DNA serta pembentukan ikatan silang protein-DNA (D'Errico et al. 2008). Walau bagaimanapun, perubahan basa tersebut tidaklah semata-mata disebabkan pembentukan 8-OHdG.



Gambar 4. Skema yang menunjukkan mekanisme perbaikan kerusakan DNA melalui daur redoks sel oleh vitamin C. (AA = ascorbic acid, DHA= dehydro ascorbic acid, LOO• = lipid peroxyl radical, NER = nucleotide excision repair, TCR = transcription coupled repair) Sumber; Lunec et al. 2002.

Gingerol sebagai salah satu bentuk senyawa fenolik yang terkandung di dalam ekstrak jahe berpotensi sebagai antioksidan, anti inflamasi, anti mutagenik dan anti karsinogenik. Gingerol mampu menurunkan ekspresi enzim nitrit oksida sintase (iNOS), α -TNF dan NFκB yang merupakan faktor transkripsi. Di sisi lain gingerol dapat pula menekan proliferasi sel kanker melalui pengaktifan sitokrom C dan kaspase sehingga terjadi peningkatan ekspresi protease pengaktif faktor-1 (Apaf-1) untuk menginduksi kematian sel. Peranan antioksidan dari gingerol ditunjukkan melalui kemampuannya menghambat oksidasi biologi dan tahap inisiasi guna mencegah aktivasi karsinogen (blocking agent) serta menghambat tahap promosi dan progresi dengan cara menekan proliferasi (Oyaqbemi et al. 2010). Dengan demikian kerusakan oksidatif selular melalui pembentukan 8-OHdG akan terhambat setelah sel kanker diberi perlakuan dengan gingerol.

Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, gingerol yang merupakan senyawa aktif di dalam jahe (*Zingiber officinale*) berkemampuan untuk mengurangi kadar 8-OHdG sel kanker hati (HepG2). Penurunan ini disebabkan sifat antioksidan dari gingerol yang dapat menghambat atau mengurangi pembentukan radikal bebas seperti 8-OHdG dan tekanan oksidatif di dalam sel kanker. Dengan begitu, jahe sangat berpotensi sebagai bahan kemopreventif untuk mengurangi pertumbuhan sel kanker.

Ucapan terima kasih

Dengan ini disampaikan terima kasih yang tidak terhingga kepada pihak Jabatan Biokimia, Fakultas Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini. Juga kepada pihak Yayasan Yarsi atas bantuan dana dalam melakukan studi ini

Daftar Pustaka

- D'Errico, M. Parlanti, E. Dogliotti, E. 2008. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutation Research*. 659: 4-14.
- Fang, Y-Z. Yang, S. Wu, G. 2002. Free radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.
- Ishiguro, K. Ando, T. Maeda, O. Ohmiya, N. Niwa, Y. Kadomatsu, K. Goto, H. 2007. Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochim. Biophys. Research Communications*. 362: 218-223.
- Lunec, J. Holloway, K.A. Cooke, M.S. Faux, S. Griffiths, H.R. Evans, M.D. 2002. Urinary 8-oxo-2-deoxyguanosine redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*. 33 (7): 875-885.
- Olinski, R. Gackowski, D. Foksinski, M. Rozalski, R. Roszowski, R. Jaruga, P. 2002. Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*. 33 (2): 192-200.
- Oyagbemi, A.A. Saba, A.B., Azeez, O.I. 2010. Molecular target of [6]-gingerol: its potential roles in cancer chemoprevention. *Biofactor*. 36(3): 169-178.
- Stoilova, I. Krastanov, A. Stoyanova, A. Denev, P. Gargova, S. 2007. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*. 102: 764-770.
- Valavanidis, A. Vlachogianni, T. Fiotakis, C. 2009. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environmental Sciences and Health Part C*. 27: 120-139.
- Wu, L-L. Chiou, C-C. Chang, P-Y. Wu, J-T. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chim. Acta*. 339: 1-9.