

# Efek biji mahkota dewa terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada *cell line* Ca colon WiDr

Anis Widyasari<sup>1</sup>, Yudanti Riastiti<sup>2</sup>, Indwiani Astuti<sup>3</sup>, Rina Susilowati<sup>4</sup>, Harijadi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa S1

<sup>2</sup> Mahasiswa S2

<sup>3</sup> Bagian Farmakologi dan Toksikologi

<sup>4</sup> Bagian Histologi dan Biologi Sel

<sup>5</sup> Bagian Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

## ABSTRACT

Anis Widyasari, Yudanti Riastiti, Indwiani Astuti, Rina Susilowati, Harijadi – *The effect of mahkota dewa seed (Phaleria macrocarpa (Scheff. Boerl.) on active caspase-3 expression in WiDr Ca colon cell line*

**Background:** *Mahkota dewa* (MD, *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) is widely used for cancer therapy, but its mechanism as anticancer has not been known yet. Recently, ethanol extract of MD seed has been shown to have cytotoxic effect on WiDr Ca colon cell line.

**Objective:** The purpose of this study is to know active caspase-3 expression in WiDr Ca colon cell line after MD treatment.

**Methods:** WiDr Ca colon cell line was incubated with ethanol extract of MD seed in three concentrations for 48 hours. Active caspase-3 expression was shown using immunohistochemistry method.

**Results:** In the cell line treated with ethanol extract of MD seed 11.35 ug/ml (1/2 IC<sub>50</sub>), 22.7 ug/ml (IC<sub>50</sub>) and 45.4 ug/ml (2xIC<sub>50</sub>), immunopositive cells had been found to be 20.4%, 49% and 63%, respectively. The cell line treated with 5-Fluorouracil (5-FU) in IC<sub>50</sub> dosage only had 27.4% immunopositive cell.

**Conclusion:** Ethanol extract of MD seed had cytotoxic effect on WiDr cell line through the increased active caspase 3 expression. The effect was greater than 5-FU.

**Key words:** *Mahkota Dewa*, WiDr cell line, Caspase 3, apoptosis, 5 FU

## ABSTRAK

Anis Widyasari, Yudanti Riastiti, Indwiani Astuti, Rina Susilowati, Harijadi – *Efek biji mahkota dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada cell line Ca colon WiDr*

**Latar belakang:** Tanaman mahkota dewa (MD, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) oleh masyarakat sering digunakan untuk pengobatan kanker, namun mekanismenya sebagai antikanker belum diketahui.

Baru-baru ini, ekstrak etanol biji MD diperlihatkan memiliki efek sitotoksik pada *cell line* Ca colon WiDr.

**Tujuan Penelitian:** Penelitian ini bertujuan mengetahui apakah kematian *cell line* Ca colon yang diberi ekstrak etanol biji MD tersebut terjadi melalui ekspresi dari caspase-3 aktif yang berperan pada jalur apoptosis.

**Metode:** *Cell line* Ca colon WiDr diinkubasi dengan ekstrak etanol biji MD dengan tiga konsentrasi yang berbeda selama 48 jam. Ekspresi caspase-3 aktif dilihat dengan metode imunohistokimia dan dihitung persentase sel imunopositif.

Anis Widyasari, Undergraduate Student of Faculty of Medicine Gadjah Mada University, Yogyakarta, Yudanti Riastiti, Graduate Student of Faculty of Medicine Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indwiani Astuti, Department of Pharmacology Faculty of Medicine Gadjah Mada University, Yogyakarta, Rina Susilowati, Department of Histology & Cell Biology, Faculty of Medicine Gadjah Mada University, Yogyakarta, Harijadi, Department of Anatomic Pathology Faculty of Medicine Gadjah Mada University Yogyakarta

**Hasil:** Pada perlakuan dengan ekstrak etanol biji MD 45,4 ug/ml ( $2 \times IC_{50}$ ), 22,7 ug/ml ( $IC_{50}$ ) and 11,35 ug/ml ( $1/2 IC_{50}$ ) ditemukan sel imunopositif sebanyak 63%, 49%, dan 20,4%. Pada perlakuan dengan 5-FU dosis  $IC_{50}$  hanya ditemukan sel imunopositif sebanyak 27,4%. Analisis dengan uji Chi-Square memberikan hasil yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

**Simpulan:** Ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) bersifat sitotoksik terhadap sel *cell line* Ca colon WiDr melalui pengaktifan caspase-3. Peningkatan dosis menyebabkan peningkatan ekspresi caspase-3 aktif. Ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) lebih poten dibanding 5-FU dalam mengaktifkan caspase-3 pada *cell line* Ca colon WiDr.

## PENGANTAR

Tanaman mahkota dewa (MD, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) oleh masyarakat Indonesia telah banyak digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit termasuk kanker<sup>1</sup>. Ekstrak etanol biji dan buah MD bersifat sitotoksik terhadap *Artemia salina* Leach<sup>2</sup>. Ekstrak etanol bijinya juga menimbulkan kematian *cell line* Ca colon WiDr dan Ca payudara T47-D<sup>3,4</sup>. Namun demikian, kandungan zat aktif dalam MD dan mekanismenya sebagai antikanker belum banyak diteliti.

Kematian sel kanker dapat terjadi dengan pengaktifan jalur apoptosis yang ditandai dengan pengaktifan caspase (*cysteineyl, aspartate-specific protease*). Caspase-3 merupakan enzim sentral yang teraktifkan melalui jalur pengaktifan *death receptor* maupun dari jalur mitokondria sehingga Caspase 3 sering dipakai sebagai petanda sel yang telah mengaktifkan program apoptosisnya<sup>5,6</sup>.

Penelitian ini ingin mengetahui apakah kematian *cell line* Ca colon WiDr yang diberi ekstrak etanol biji buah MD tersebut terjadi dengan pengaktifan jalur apoptosis dengan melihat ekspresi caspase-3 aktif.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian dilakukan di Bagian Histologi dan Biologi Sel FK UGM tahun 2004.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *cell line* Ca colon WiDr, diperoleh dari Laboratorium Ilmu Hayati UGM (koleksi Drs. M. Ghufron M.S.) dan ekstrak etanol mahkota dewa. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain: RPMI 1640, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, fungizon, Penisilin + Streptomisin (penstrep), tripsin, 5-Fluorouracil, 3% hidrogen peroksidase dalam metanol, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), substrat *1,3-Diamino Benzidin* (DAB), konjugat streptavidin terhadap

peroksidase, streptavidin, antibodi biotinilasi sekunder (*biotinylated anti-rabbit secondary antibody*), aquades, PBS/0,1% Tween 20, serum normal, antibodi anti caspase-3 aktif (Promega), Hematoksin, alkohol 70%-90%, Xylena, *mounting media*.

### Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas, neraca analitik (Sartorius), blender (National), penyaring 360 *mesh* dan *rotary evaporator* (Laboratorium Equipment Sydney), *microplate* 24 sumuran, *cover slip*, *tissue culture flask* (TCF) 75 cm<sup>2</sup>, tabung 15 ml, tabung 50 ml, pipet Eppendorf, *yellow tip*, *blue tip*, inkubator CO<sub>2</sub>, *laminary flow cabinet*, *blue tip*, *yellow tip*, gelas obyek, mikroskop cahaya.

### Cara Penelitian

Penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap, antara lain

#### 1. Pembuatan Ekstrak

Biji MD diblender sampai halus, disaring, kemudian direndam dalam etanol selama 24 jam. Selanjutnya ampas diperas dan disaring. Hal tersebut diulangi sampai tiga kali. Cairan diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan cairan yang pekat.

#### 2. Penanaman Sel

*Cell line* Ca colon WiDr dikultur dalam medium RPMI 1640 yang ditambah streptomisin 2%, fungizon 0,5% dan FBS 10%. Dalam *microplate* 24 sumuran yang telah diberi *cover slip*, masing-masing ditanam sebanyak 500.000 sel. Terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu perlakuan dengan ekstrak etanol biji MD 45,4 ug/ml ( $2 \times IC_{50}$ ), 22,7 ug/ml ( $IC_{50}$ ), 11,35 ug/ml ( $1/2 \times IC_{50}$ ), 5-flourouracil (5-FU) 46,56 ug/ml ( $IC_{50}$ )<sup>3</sup> dan kontrol negatif. Selanjutnya

sel diinkubasi dalam almari lembab dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C selama 48 jam.

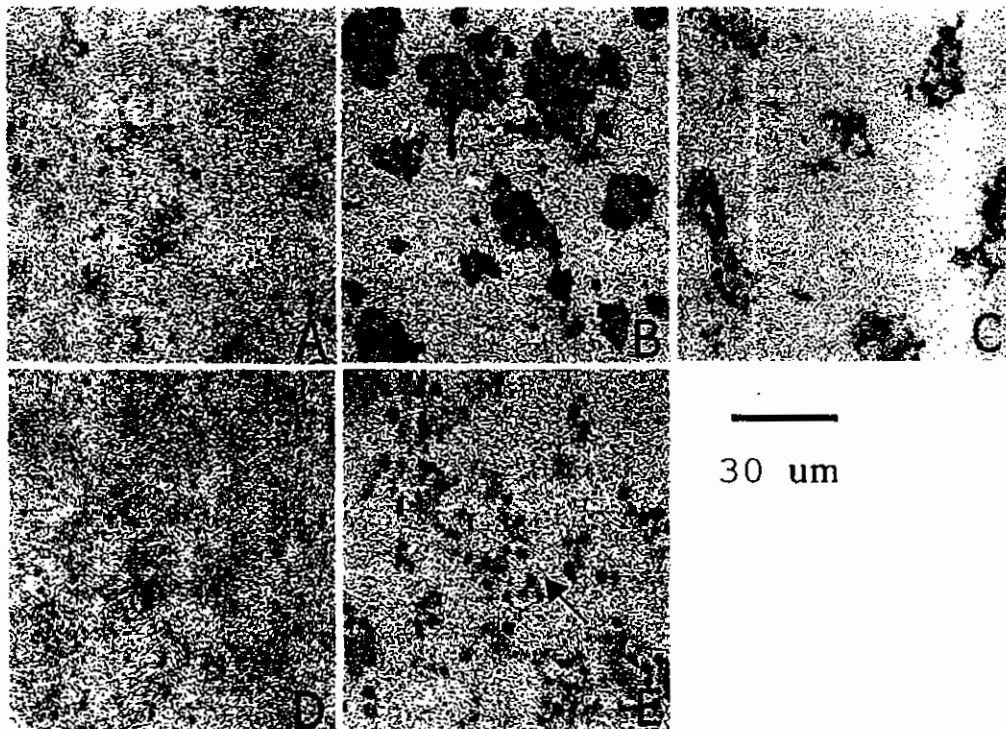
### 3. Uji Immunohistokimia

Sel pada *cover slip* difiksasi dengan paraformaldehid 2% dalam PBS selama 5 menit. Setelah dicuci dengan PBS, peroksidase endogen diblok dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol. Sel diinkubasi dengan serum normal, dilanjutkan inkubasi dengan antibodi anti-Caspase 3 aktif dengan pengenceran 1:200 selama 24 jam pada suhu 4°C. Sel imunopositif diperlihatkan dengan metode imunoperoksidase dengan pemberian substrat DAB. Seluruh inti sel dicat dengan hematoksin sehingga seluruh sel baik yang imunopositif dan imunonegatif dapat dihitung. Hasil yang akan didapat adalah persentase sel imunopositif dari 500 sel pada setiap kelompok. Perbedaan persentase sel imunopositif pada masing-masing kelompok diuji dengan Uji Chi-Square.

## HASIL PENELITIAN

Sel kanker yang masih hidup berbentuk poligonal membentuk satu lapisan sel pada gelas penutup. Sedangkan sel yang mati bentuknya menjadi bulat dan ukurannya lebih kecil daripada sel hidup. Sel kanker kolon WiDr yang mengekspresikan caspase-3 aktif berwarna coklat pada inti dan sitoplasmanya dan sel imunonegatif hanya berwarna biru pada intinya karena pengecatan hematoksin (GAMBAR 1).

Pada kelompok tanpa perlakuan (GAMBAR 1D) hampir tidak ditemukan adanya sel imunopositif. Pada kelompok tersebut sel terlihat tersebar padat, melekat pada gelas penutup. Sel WiDr yang diberi perlakuan dengan ekstrak etanol biji MD sebesar  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  memperlihatkan adanya sel imunopositif yang tersebar (GAMBAR 1A). Morfologi sel secara umum masih belum banyak memperlihatkan perbedaan dengan sel yang tidak diberi perlakuan. Pemberian dosis ekstrak etanol biji MD sebesar  $IC_{50}$  membuat

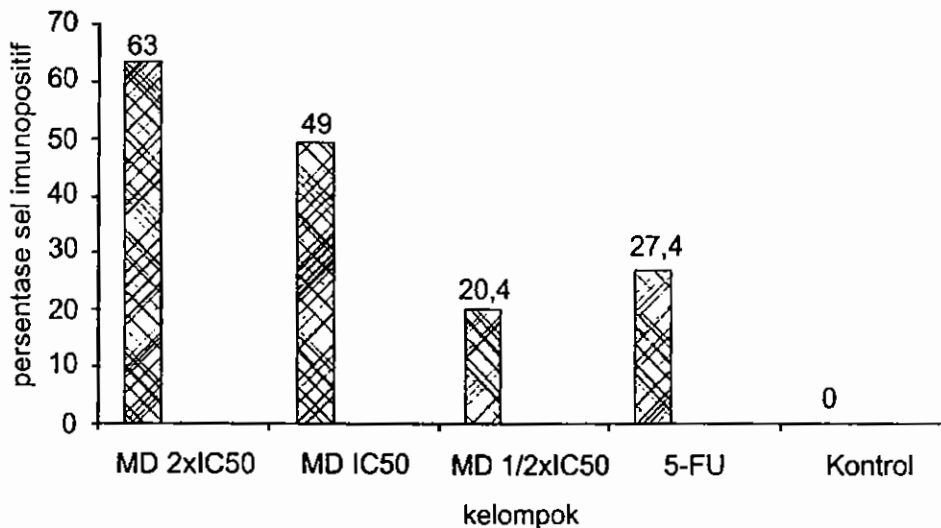


GAMBAR 1. Immunohistokimia sel WiDr dengan antibodi anti-caspase-3 aktif. Sel difiksasi 48 jam setelah perlakuan. A. Mahkota dewa  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , B. Mahkota dewa  $IC_{50}$ , C. Mahkota dewa  $2 \times IC_{50}$ , D. tanpa perlakuan, E. 5-FU. Tanda panah menunjukkan sel immunopositif terlihat sebagai sel dengan warna kecokelatan pada sitoplasma.

semakin banyak sel imunopositif yang terlihat (GAMBAR 1B) dibandingkan dengan kelompok sel yang diberi ekstrak etanol biji MD dengan dosis sebesar  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ . Pada kelompok ini sel tidak lagi tersebar merata pada *cover slip*, namun terlihat membentuk kelompok-kelompok sel. Jumlah sel pada kelompok ini terlihat berkurang dibanding pada kelompok yang diberi dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , namun ukuran sel terlihat masih belum jauh berbeda dengan yang terlihat pada kelompok tanpa perlakuan dan kelompok perlakuan dengan dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ . Pemberian dosis  $2 \times IC_{50}$  (GAMBAR 1C) juga menjadikan sel tergabung dalam kelompok-kelompok sel. Ukuran sel menjadi lebih kecil dengan jumlah sel imunopositif yang lebih banyak dibanding jumlah sel imunopositif pada kelompok  $IC_{50}$ . Namun demikian, sel imunonegatif juga masih dapat ditemukan pada kelompok ini. Pemberian 5-FU dosis  $IC_{50}$  (46.56 ug/ml) juga memberi gambaran

berkurangnya jumlah sel dengan adanya sel imunopositif yang lebih sedikit daripada sel imunopositif pada kelompok perlakuan dengan ekstrak MD  $IC_{50}$  (GAMBAR 1E).

Perbedaan kelompok perlakuan 5-FU dengan perlakuan ekstrak etanol biji MD adalah sel pada kelompok perlakuan 5-FU terlihat lebih tersebar dengan ukuran yang tidak jauh berbeda dengan ukuran sel pada kelompok tanpa perlakuan. Pada setiap kelompok diamati dan dihitung jumlah sel imunopositif pada 500 sel. Hasil perhitungan diperlihatkan pada GAMBAR 2. Pada GAMBAR 2 terlihat bahwa perlakuan dengan ekstrak etanol biji MD dosis  $IC_{50}$  terdapat sel imunopositif sebesar 49,0%, sedangkan pada pemberian 5-FU sebesar  $IC_{50}$  dapat ditemukan sel imunopositif sebanyak 27,4%. Uji Chi-Square memberi hasil yang bermakna pada semua kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ).



GAMBAR 2. Persentase sel imunopositif pada lima kelompok perlakuan. Persentase tertinggi ada pada kelompok MD2x $IC_{50}$ . Pada kelompok kontrol tidak ditemukan sel imunopositif. Sel imunopositif pada kelompok 5-FU lebih rendah daripada kelompok MD $IC_{50}$ .

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian terlihat bahwa peningkatan dosis ekstrak etanol MD menyebabkan peningkatan persentase sel yang mengekspresikan caspase-3 aktif. Dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  MD hanya menyebabkan kematian sel kurang dari seperlima jumlah sel;

jumlah sel masih belum terlalu jauh berkurang dibanding jumlah sel pada kelompok kontrol negatif. Pada dosis  $IC_{50}$  ekstrak etanol biji MD terlihat bahwa jumlah sel telah jauh berkurang dibanding kontrol negatif dan bahkan bila dibanding jumlah sel pada perlakuan dengan dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ .

Bila dibanding pemberian 5-FU yang juga menggunakan dosis  $IC_{50}$ , dapat kita lihat bahwa ekstrak etanol biji MD mengakibatkan kematian sel yang lebih banyak. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan bahwa mekanisme pengaktifan caspase-3 oleh ekstrak etanol biji MD melalui titik tangkap yang berbeda dengan mekanisme yang terjadi pada pemberian 5-FU. Ekstrak etanol MD juga mungkin memiliki lebih dari satu zat aktif sehingga ekstrak MD bekerja melalui beberapa titik tangkap yang berbeda dan menghasilkan efek yang lebih besar daripada 5-FU dalam mengaktifkan caspase-3.

5-FU telah diketahui mengaktifkan caspase-3<sup>7</sup>. Di dalam tubuh, 5-FU diubah menjadi *5-Fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monophosphate* (5-FdUMP) yang menghambat aktivitas dari *thymidylate synthase* (TS), enzim yang berperan pada sintesis *de novo* dTMP (*deoxythymidine monophosphate*) dari dUMP (*deoxyuridin mono phosphate*). Penghambatan enzim tersebut akan menyebabkan kerusakan DNA yang akan mengaktifkan proses apoptosis, akhirnya terjadilah "*thymineless death*", kematian sel sebagai akibat terhambatnya aktivitas TS<sup>8</sup>. Sejak diperkenalkan oleh Berger *et al* (1957), 5-FU benar-benar menjadi obat antineoplasma yang paling penting dalam terapi kanker kolorektal<sup>9</sup>. Namun 5-FU hanya bisa menyembuhkan kanker kolon sebesar 8-85%<sup>10</sup> dan karsinoma hepatoselular sebesar 21,5%<sup>11</sup>. Mekanisme terjadinya resistensi sel kanker terhadap obat ini antara lain dapat disebabkan mutasi gen yang mengkode TS atau defisiensi *5,10-methylene tetrahydrofolate* yang mempertahankan kompleks FdUMP dan TS<sup>9</sup>. Karena itu diperlukan obat lain yang dapat digunakan pada kasus resistensi 5-FU.

Ekstrak etanol MD mengaktifkan caspase-3 pada sel WiDr namun belum diketahui di mana titik tangkap sebenarnya. Namun, bila melihat zat aktif yang terkandung di dalamnya<sup>12</sup>, ekstrak etanol biji MD kemungkinan bekerja melalui kandungan flavonoid, alkaloid, dan saponinnya. Flavonoid diketahui memacu apoptosis dengan meningkatkan kadar protein pro-apoptosis Bax dan Bad serta menurunkan kadar protein anti-apoptosis Bcl-2 dan Bcl-xl<sup>13</sup>. Sementara itu, efek anti kanker alkaloid telah dibuktikan pada tanaman tapak dara<sup>14</sup>. Alkaloid memacu apoptosis dengan meningkatkan permeabilitas membran

mitokondria sehingga terjadi pelepasan sitokrom c menuju sitosol<sup>15</sup>. Saponin juga telah diketahui memiliki aktivitas dalam memacu apoptosis, tetapi belum diketahui letak titik tangkapnya<sup>16</sup>.

Untuk dapat lebih memahami efek sitotoksik ekstrak etanol biji MD pada sel kanker perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui titik tangkap pengaktifan jalur apoptosis oleh ekstrak etanol biji MD ini. Selain itu perlu juga dipelajari lebih lanjut zat aktif yang terkandung di dalamnya. Efek pada sel normal juga perlu dipelajari sehingga dapat mengurangi efek samping bila nantinya dapat digunakan dalam terapi kanker. Pengujian *in vivo* merupakan langkah selanjutnya dalam upaya pengembangan biji MD sebagai obat pada terapi kanker terutama pada kasus yang telah mengalami resistensi terhadap 5-FU.

## SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat diambil simpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) bersifat sitotoksik pada sel *cell line* Ca colon WiDr melalui pengaktifan caspase-3. Peningkatan dosis menyebabkan peningkatan ekspresi caspase-3 aktif.
2. Ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) lebih poten dibandingkan dengan 5-FU dalam mengaktifkan caspase-3 pada *cell line* Ca colon WiDr.

## SARAN

1. Perlu dipelajari lebih lanjut zat aktif yang terkandung pada ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang dapat mengaktifkan caspase-3.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui titik tangkap molekular pengaktifan jalur apoptosis oleh ekstrak etanol biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dengan Dana Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada tahun 2004.

## KEPUSTAKAAN

1. Harmanto N. Sehat dengan Ramuan Tradisional Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa. Jakarta: Agro Media Pustaka, 2001.
2. Purwantini I, Setyowati EP dan Hertiani P. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol: Buah, Biji, Daun Makuto Dewo (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasia Indonesia* 2002;13(2):101-6.
3. Riastiti Y. Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap Proliferasi dan Apoptosis Sel Ca Colon [thesis], Program Pasca Sarjana: Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2005.
4. Bakhriansyah M. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Biji Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dan Pengaruhnya terhadap Ekspresi Siklooksigenase-2 Sel Kanker Payudara [thesis], Program Pasca Sarjana: Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2004.
5. Kasibhatla S dan Tseng B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?. *Molecular Cancer Therapeutics* 2003;2:573-80.
6. Smolewski P, Darzynkiewicz Z, Robak T. Caspase-mediated Cell Death in Hematological Malignancies: Theoretical Considerations, Method of Assessment, and Clinical Implications. *Leukimia & Lymphoma* 2003;44(7):1089-104.
7. Tamaki T and Naomoto Y. Apoptosis in Normal Tissue Induced by Anti-Cancer Drugs. *The Journal of International Medical Research* 2003;31:6-16.
8. Katzung BG, Trevor's AJ. *Pharmacology-Examination and Board Review*. 6<sup>th</sup> ed. Singapore: Mc.GrawHill, 2003
9. Devita VT, Hellman S. *Cancer – Principles and Practice of Oncology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2001.
10. Moertel CG. *Chemotherapy for Colorectal Cancer*. *The New England Journal of Medicine*. [serial online] 2001 April 21 [cited 2005 Nophember 23]. Available from URL: <http://www.nejm.org>
11. Enjoji M. Re-evaluation of Antitumor Effects of Combination Chemotherapy with Interferon-a and 5-fluorouracil for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol* [serial online] 2005 September 28 [cited December 17]; 11(36):5685-87.
12. Padua LS, Bunyapraphatsara N, Lemmens RHMJ. *Plant Resources of Soth-East Asia*. Bogor: Prosea, 1999.
13. Nichenametla SN. A Review of the Effects and Mechanism of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006;46:161-83.
14. Soedibyo M. *Alam Sumber Kesehatan : Manfaat dan Kegunaan*. Jakarta: Balai Pustaka, 1998.
15. Kluza J. Apoptosis Induced by the Alkaloid Sampangine in HL-60 Leukimia Cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003;1010:331-34.
16. Hoffmann JJ. Triterpenoid Saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) Decrease Tumor Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Cancer Research* 2001;61:5486-90.