

Sitotoksisitas rimpang temu mangga (*Curcuma Mangga* Val. & V. Zijp.) dan kunir putih (*Curcuma Zedoaria* L.) terhadap beberapa sel kanker manusia (*in vitro*) dengan metoda SRB

Mae Sri Hartati W¹, Sofia Mubarika¹, Bolhuis RLH², Nooter K², Oostrum RG², Boersma AWM², Subagus Wahyuono³

¹Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, ²University Hospital Rotterdam-Daniel den Hoed Cancer Center, Rotterdam, the Netherlands, ³Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Mae Sri Hartati W, Sofia Mubarika, R. L. H. Bolhuis, K. Nooter, R. G. Oostrum, A. W. M. Boersma, Subagus Wahyuono - *Cytotoxic effect on human cancer cell using SRB method (in vitro) rimpang temu mangga (Curcuma Mangga Val. & V. Zijp.) dan kunir putih (Curcuma Zedoaria L.).*

Background: Temu mangga (*Curcuma mangga*) and kunir putih (*Curcuma zedoaria*) rhizomes have been utilized by people to treat cancer lately although clinically their activity has not been tested.

Objectives: This study is aimed to prove their activity as anticancer on 7 major human cancers cell lines (*in vitro*), and to evaluate whether these two rhizomes are potential for new anticancer drug.

Methods: The two rhizomes were separately extracted with chloroform followed by methanol to give chloroform extracts of *C. mangga* (CmCh) and *C. zedoaria* (CzCh); and methanol extracts of *C. mangga* (CmMe) and *C. zedoaria* (CzMe) respectively. These extracts were tested their cytotoxic effect on 7 major human cancer cell lines using SRB method (*in vitro*). Doxorubicin and cisplatin were used as positive controls, and their cytotoxic effects were measured by comparing their ID₅₀ with that of the positive controls.

Results: Those four extracts (CmCh, CzCh, CmMe and CzMe) practically did not perform cytotoxic effect on those human cancer cell lines, because the extract's ID₅₀ was far higher than the positive controls on those human cancers cell lines

Conclusion: The *C. mangga* and *C. zedoaria* rhizomes did not active as anticancer and they were not potential as the source of a new anticancer drug.

Key words: anticancer - *Curcuma mangga* - *Curcuma zedoaria* - cytotoxic - drug discovery

ABSTRAK

Mae Sri Hartati W, Sofia Mubarika, R. L. H. Bolhuis, K. Nooter, R. G. Oostrum, A. W. M. Boersma, Subagus Wahyuono - *Sitotoksisitas rimpang temu mangga (curcuma Mangga Val. & V. Zijp.) dan kunir putih (curcuma Zedoaria) terhadap beberapa sel kanker manusia (in vitro) dengan metoda SRB.*

Latar belakang: Rimpang temu mangga (*Curcuma mangga*) dan kunir putih (*Curcuma zedoaria*) akhir-akhir ini banyak digunakan masyarakat untuk mengobati kanker. Namun demikian bukti-bukti secara ilmiah belum banyak dilaporkan.

Tujuan penelitian: Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek sitotoksik *in vitro* kedua rimpang tersebut terhadap 7 sel kanker manusia, dan mengevaluasi apakah kedua rimpang tersebut potensial dikembangkan sebagai bahan obat antikanker baru.

Metodologi: Masing-masing rimpang diekstraksi dengan kloroform sehingga diperoleh ekstrak kloroform *C. mangga* (CmCh) dan *C. zedoaria* (CzCh), dan diikuti dengan metanol sehingga diperoleh ekstrak metanol *C. mangga* (CmMe) dan *C. zedoaria* (CzMe). Keempat ekstrak diuji efek sitotoksiknya dengan metoda SRB pada 7 sel kanker manusia (*in vitro*). Doksorubisin dan sisplatin digunakan sebagai kontrol positif, dan sifat sitotoksik ekstrak ditentukan dengan membandingkan nilai IC_{50} ekstrak dengan IC_{50} dari kontrol positif.

Hasil: Hasil uji menunjukkan bahwa ke empat ekstrak (CmCh, CmMe, CzCh dan CzMe) tidak bersifat sitotoksik terhadap 7 sel kanker manusia (*in vitro*) dibandingkan dengan kontrol positif, karena IC_{50} ekstrak tersebut jauh lebih besar dari IC_{50} kontrol positif.

Simpulan: Rimpang *C. mangga* dan *C. zedoaria* tidak aktif terhadap 7 sel kanker manusia sehingga tidak potensial digunakan sebagai sumber bahan untuk obat antikanker baru.

(B.I.Ked. Vol. 35, No.4: 197-201, 2003)

PENGANTAR

Indonesia dikenal sebagai negara kepulauan yang mempunyai keanekaragaman hayati nomor dua terbesar didunia. Masyarakat Indonesia telah lama menggunakan obat tradisional untuk menjaga kesehatan, kecantikan dan mengobati penyakit yang dideritanya. Akhir-akhir ini rimpang temu mangga (*Curcuma mangga*) dan kunir putih (*Curcuma zedoaria*) digunakan untuk mengobati kanker meskipun khasiatnya belum diketahui secara pasti.

Dengan slogan *Back to Nature* yang didevungkan di seluruh dunia sekarang ini maka peran bahan obat tradisional atau ekstraknya menjadi semakin besar karena bahan tersebut dapat menjadi sumber obat baru di masa yang akan datang.

Mengingat sitotoksik merupakan salah satu sifat dasar yang diharapkan pada obat-obat antikanker, maka metoda uji sitotoksik dapat digunakan untuk menentukan apakah senyawa atau ekstrak berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker ataukah tidak sama sekali.

Metoda uji sitotoksik dengan sulforhodamine B (SRB)^{1,2} adalah salah satu metoda uji sitotoksik *in vitro* berdasarkan atas *chemosensitivity* dan digunakan secara ekstensif untuk menentukan sitotoksitas obat-obat antikanker. Penelitian ini bertujuan menentukan sitotoksitas *C. mangga* dan *C. zedoaria* serta mengetahui potensi kedua bahan tersebut untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker.³

BAHAN DAN CARA

Bahan: Rimpang *C. mangga* (no. koleksi BF # 064) dan *C. zedoaria* (no. koleksi BF # 065) diperoleh di Yogyakarta pada bulan Februari 2002, dan diidentifikasi di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Serbuk kering rimpang (250 g) dari *C. mangga* dan *C. zedoaria* secara terpisah dimaserasi dengan $CHCl_3$ dan diikuti dengan metanol (MeOH). Penguapan dilakukan dengan pompa vakum sehingga diperoleh ekstrak kering *C. mangga* (CmCh dan CmMe) dan *C. zedoaria* (CzCh dan CzMe).

Pembuatan larutan stok uji: Larutan stok uji dibuat sebagai 5 mg ekstrak/ml. Ekstrak kloroform (5,0 mg) dilarutkan dalam EtOH absolut (1,0 ml) dan ekstrak methanol dilarutkan dalam DMSO (1,0 ml) sebelum dilarutkan dalam media kultur sel (Gibco, Grand Island, New York, USA).

Kondisi kultur sel kanker: Penelitian ini menggunakan 7 jenis kanker sel manusia yaitu sel kanker payudara (MFC7), kanker ginjal (A498), kanker paru-paru (H226), kanker payudara (EVSA-T), melanoma (M19), kanker kandung (IGROV), dan kanker kolon (WIDR). Kecuali MCF7, sel kanker tersebut masih digunakan untuk *Screening Panel* dari National Cancer Institute (NCI), USA⁴. Semua sel disimpan dalam media RPMI 1640 ditambah 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, New York, USA), 100 mg/ml streptomisin, 100 units/ml penisilin dan 2 mM glutamine, diinkubasi pada suhu 37°C, CO₂ 8,5%⁵

Uji sitotoksik: Uji sitotoksik dilakukan dengan metoda SRB yang telah dilakukan oleh Skehan *et al*² menggunakan *mikroplate* 96 wells (Falcon, 3072 BD). Percobaan dimulai dengan memasukkan 150 ml suspensi sel per *well* (1500-2000 sel/*well*), kemudian diinkubasi pada 37° C dan 8,5% CO₂ selama 48 jam. Ke dalam *plate* ditambahkan 50 ml/*well* sejumlah ekstrak dari *stock* sehingga konsentrasi tertinggi 62,5 mg/ml (n= 4). Deret kolom 1 digunakan untuk kontrol sel, deret kolom 2 untuk kontrol medium. *Plates* diinkubasi pada 37° C, 8,5% CO₂, selama 5 hari. Setelah inkubasi ekstrak dan medium dibuang, lalu sel yang tertinggal di fiksasi dengan trikloroasetat (TCA 10%) (150 ml/*well*) kemudian ditempatkan pada temperatur 4° C selama 1 jam. TCA dibuang dan *plate* dicuci dengan aquadest 3 kali. SRB (0,4%) ditambahkan (50 ml/*well*) dan digoyang selama 15 menit. SRB dibuang kemudian dicuci dengan 1% asam asetat. *Plate* dikeringkan di udara terbuka, kemudian ditambahkan 150 ml tris base [tris(hidroksi-metil)aminometana], dan digoyang 10 menit. Absorbansi dibaca pada 540 nm dengan menggunakan *automated microplate reader* (Lab Systems Multiskan MS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Menentukan sifat sitotoksik merupakan langkah utama dalam usaha penemuan obat antikanker baru dari bahan alam^{6,7}. Penelitian antikanker yang bertitik berat pada bagaimana mekanisme sel kanker terbunuh oleh obat-obat sitotoksik merupakan ilmu yang baru berkembang dewasa ini. Oleh karena itu dikatakan bahwa kematian sel merupakan kejadian yang terprogram yang disebabkan oleh interaksi antara molekul obat dengan target molekul intraselular dengan akibat kematian pada sel. Target molekul intraselular yang diharapkan adalah sebagai target yang spesifik terdapat pada sel kanker saja sehingga sel normal tidak terganggu dengan adanya molekul obat tersebut. Sampai dewasa ini belum ditemukan obat antikanker yang tidak mempunyai efek samping atau efek merugikan sel normal. Karena itu usaha penemuan obat baru masih terus berlanjut di antaranya dari bahan-bahan alam. Rimpang *C. mangga* dan *C. zedoaria* dewasa ini banyak

dimanfaatkan masyarakat untuk mengobati penyakit kanker, meskipun belum terbukti manfaatnya. Pada uji toksisitas akut perasan rimpang *C. mangga* tidak menunjukkan efek toksik⁸. Pada penelitian menggunakan rimpang *C. zedoaria*, uji toksisitas awal ekstrak kloroform dengan larva *Artemia salina* sebagai model tidak menunjukkan adanya efek toksik⁹. Untuk itu, uji awal antikanker terhadap sel kanker manusia *in vitro* perlu dilakukan untuk menentukan IC₅₀ dan selektivitas sel kanker dari kedua rimpang tersebut.

Upaya penemuan obat baru antikanker diawali dengan ekstraksi bahan dengan kloroform (CHCl₃) dan metanol (MeOH) dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa polaritas rendah (non polar) (CmCh dan CzCh) dari senyawa-senyawa polaritas tinggi (CmMe dan CzMe). Penelusuran senyawa aktif lebih lanjut akan dilakukan ketika salah satu atau dua ekstrak tersebut menunjukkan penghambatan bermakna terhadap pertumbuhan sel kanker (*in vitro*) dengan metoda *bioassay guided solvent extraction and partition* dan isolasi senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitasnya.

Hasil uji penghambatan (IC₅₀) terhadap 7 sel kanker manusia (*in vitro*) dari CmCh, CmMe, CzCh dan CzMe dipresentasikan pada TABEL 1. Tabel ini juga diperjelas dengan histogram yang tertera pada GAMBAR 1. IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*) adalah nilai respons yang pada konsentrasi tertentu menimbulkan penghambatan 50% populasi sel yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai¹⁰

Berdasarkan data IC₅₀ dari bahan uji dan kontrol positif terhadap sel kanker uji, nampak bahwa baik *C. mangga* (CmCh, CmMe) maupun *C. zedoaria* (CzCh, CzMe) tidak berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker di atas. Hal ini terbukti dengan nilai IC₅₀ kontrol positif (doksorubisin dan sisplatin) yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan IC₅₀ ekstrak rimpang *C. mangga* dan *C. zedoaria* bahkan CmMe mempunyai IC₅₀ lebih tinggi dari dosis uji tertinggi (> 62,5 mg/ml) pada kultur sel kanker (H226, IGROV dan M19), Hal ini jelas terlihat pada histogram dari ketiga jenis sel tersebut. (GAMBAR 1).

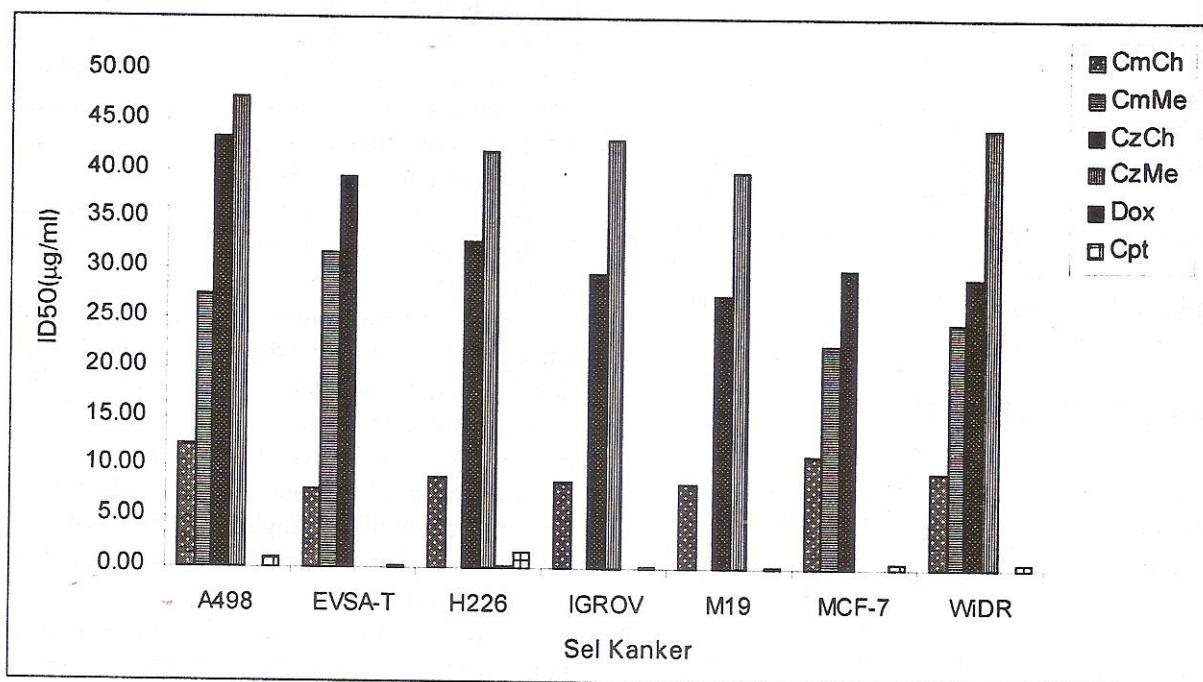
Penggunaan kedua rimpang tersebut sebagai antikanker masih sangat luas. Hal ini mungkin disebabkan oleh informasi penelitian yang telah

TABEL 1. IC₅₀ (mg/ml) dari CmCh, CmMe, CzCh dan CzMe terhadap pertumbuhan 7 sel kanker manusia *in vitro*, dengan dosis uji tertinggi 62,5 mg/ml

Bahan uji	Sel kanker/ID50 (µg/ml)						
	A498	EVSA-T	H226	IGROV	M19	MFC7	WiDR
Doksorubisin	0,09	0,009	0,13	0,02	0,02	0,006	0,014
Sisplatin	1,05	0,25	1,52	0,16	0,24	0,61	0,54
CmCh	12,31	7,79	8,98	8,67	8,39	11,21	9,74
CmMe	27,49	31,62	>62,5	>62,5	>62,5	22,33	24,64
CzCh	43,34	39,39	32,83	29,54	27,40	30,10	29,14
CzMe	47,34	>62,5	41,84	43,19	39,97	>62,5	44,42

Catatan:

CmCh= Ekstrak kloroform *C. mangga*, CmMe= Ekstrak metanol *C. mangga*, CzCh= Ekstrak kloroform *C. zedoaria*, CzMe= Ekstrak methanol *C. zedoaria* A498= kanker ginjal, EVSA-T= kanker payudara, H226= kanker paru-paru, IGROV= kanker kandung, M19= melanoma, MCF7= kanker payudara WiDR= kanker kolon



GAMBAR 1. IC₅₀ (µg/ml) dari CmCh, CmMe, CzCh dan CzMe terhadap pertumbuhan 7 sel kanker manusia *in vitro*, dengan dosis uji tertinggi 62.5 µg/ml

dilakukan dan hampir semuanya mengarah ke aktivitas antikanker tingkat molekular. Sebagai contoh misalnya, kurkuminoids (kurkumin, desmetoksikurkumin, dan dimetoksikurkumin) hasil isolasi dari *C. zedoaria*, bersifat sitotoksik pada kultur sel kanker ovarium pada manusia (OVCAR-3) dengan CD₅₀ berturut-turut sebagai 4,4, 3,8, dan 3,1 mg/ml¹¹, dan sifat sitotoksiknya disebabkan karena kemampuan kurkuminoids menghambat

produksi atau pelepasan macrophage TNF-alfa¹². Selain kurkuminoids dan seskuiterpena yang dilaporkan aktif sebagai antikanker, kelas senyawa polisakarida akhir-akhir ini juga dilaporkan berperan dalam aktivitas antikanker. Polisakarida dari *C. zedoaria* dilaporkan aktif sebagai antitumor, genotoksik, dan antiklastogenik, senyawa ini mampu memperkecil tumor pada tikus dan menghambat *chromosomal mutation*¹³. Selanjutnya polisakarida

dari *C. zedoaria* diduga mampu berperan sebagai *biological response modifier* melalui stimulasi aktivitas macrophage¹⁴. Mengingat kandungan senyawa fenolik dalam kedua rimpang *C. mangga* dan *C. zedoaria* sangat dominan maka dimungkinkan sekali bahwa kedua rimpang tersebut berperan sebagai *chemopreventive* atau *chemoprotective* karena senyawa fenolik alami pada umumnya bersifat sebagai antioksidan yang merupakan syarat sebagai *chemopreventive*. Senyawa-senyawa *chemopreventive* mampu memblokir *procarcinogen* berubah menjadi *carcinogen* sehingga kerusakan DNA dan mutagenesis (*initiated cells*) tidak pernah terjadi. Senyawa *chemopreventive* juga mampu menekan proses *promotion* dan *progression* yaitu perubahan dari *initiated cells* menjadi *malignant cancer cells*¹⁵.

Berdasarkan data uji sitotoksik di atas dan informasi ilmiah penelitian terhadap kedua rimpang tersebut maka disimpulkan bahwa kedua rimpang tersebut tidak berpotensi digunakan sebagai sumber bahan obat baru anti kanker.

SIMPULAN

Kedua rimpang (*C. mangga* dan *C. zedoaria*) tidak berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber bahan obat antikanker baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada KWF Netherland atas bantuan dana penelitian ini dan juga pada Bagian onkologi, University Hospital Rotterdam-Erasmus Medical Center–Daniel den Hoed Cancer Center atas fasilitas laboratorium.

KEPUSTAKAAN

1. Perez RP, Goodwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulrhodamine B assay for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines, Euro. J. Cancer. 1993; 29A(3): 395-99.
2. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMohan J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, J. Natl. Cancer Inst., 1990; 82: 1107-12.
3. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, Van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing, Euro J Cancer 1991; 27(7): 897-900.
4. Boyd MR. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screening. Principles and practice of oncology. 1989.
5. Boersma AWM, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein in isothiocyanate-labelled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. Cytometry. 1996; 123-30.
6. Nooter K. The role of P₅₃ in resistance to cytotoxic therapy of human cancer. South West Cancer News. 1997; 4, 12-13.
7. Nooter K, Burger H, Schenk P, Stoter G. Molecular mechanisms of drug resistance and sensitivity. Oncological Research at the Erasmus University Rotterdam-University Hospital Rotterdam. 1999; 39-40.
8. Kurniawati E, Kusumastuti R, Wahyuono S. Toksisitas akut perasan rimpang temu mangga (*Curcuma mangga Val.*) pada mencit jantan. Majalah Obat Tradisional. 2002; 6(18): 25-32.
9. Wahyuono S, Wahyuningsih MSH. Brine shrimp lethality test (BST) dari bahan tanaman yang dilaporkan dapat digunakan sebagai antikanker. Majalah Obat Tradisional. 1998; 3(6): 142-53.
10. Rajbhandari M, Wegner U, Julich M, Schopke T, Mentel R. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. J Ethnopharmacol. 2001; 74, 251-55.
11. Syu WJ, Shen CC, Don MJ, Ou JC, Lee GH, Sun CM. Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. J Nat Prod 1998 Dec; 61(12): 1531-34.
12. Jang MK, Sohn DH, Ryu JH. A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF-alpha release from *Curcuma zedoaria*. Planta Medica. 2001 Aug; 67(6): 550-52.
13. Kim KI, Kim JW, Hong BS, Shin DH, Cho HY, Kim HK, et al. Antitumor, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. Mol Cells. 2000 Aug. 31; 10(4):392-98.
14. Kim KI, Shin KS, Jun WJ, Hong BS, Shin DH, Cho Hy, Chang HI, et al. Effects of polysaccharides from rhizome of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Nov; 65(11): 2367-69.
15. Wahyuono S. Obat asli Indonesia. Majalah Obat Tradisional. 2002;7(20): 19-24.