

CYTOTOXICITY IDENTIFICATION OF THE SUPERNATANT OF *Manihot esculenta* Crantz RHIZOME AS RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN TO NORMAL CELL***Sitotoksitas Supernatan Umbi Manihot esculenta Crantz dengan Aktivitas Ribosome-Inactivating Protein terhadap Sel Normal Dibandingkan terhadap Sel Kanker***

Endang Astuti, Sabirin Matsjeh, Winarto Haryadi, Deni Pranowo, Nuning Sri Mulatsih
Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Gadjah Mada University, Yogyakarta

Received 4 March 2004; Accepted 2 June 2004

ABSTRACT

The supernatant of Manihot esculenta Crantz rhizome has been used as an alternative remedy of infectious and cancer in Jogjakarta. Cytotoxicity assay showed that Manihot esculenta Crantz supernatant had cytotoxic effect to cancer cell line, namely Myeloma ($LC_{50} = 180,24 \mu\text{g/mL}$) and HeLa ($LC_{50} = 415,55 \mu\text{g/mL}$), but have a little cytotoxic effect to SiHa. This research was aimed to identify cytotoxic activity of Manihot esculenta Crantz's supernatant to normal cell, particularly to human mononuclear cell and Vero cell line, and to compare to the cancer cell lines. The result showed that supernatant of M. esculenta had cytotoxic effect to normal mononuclear cell ($LC_{50} = 564,00 \mu\text{g/mL}$) and Vero cell line ($LC_{50} = 686,00 \mu\text{g/mL}$). The supernatant of M. esculenta had the highest cytotoxic activity to myeloma and relatively toxic to cervix cancer HeLa and normal cell, but less to SiHa.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz, Ribosome-inactivating Protein (RIP), cytotoxic, normal cell, cancer cell

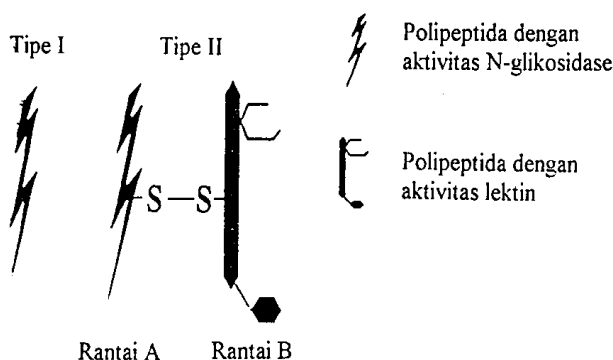
PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit genetik yang muncul dari akumulasi mutasi yang selanjutnya menjadi sel-sel kanker yang pertumbuhannya tak terkendali. Kanker merupakan penyakit yang sangat ditakuti, khususnya di Indonesia karena angka keberhasilan pengobatannya rendah, apalagi bila penderita datang kepada dokter dalam stadium lanjut [1]. Pengobatan kanker pada stadium lanjut bisa dilakukan dengan operasi, radiasi dan kemoterapi, namun sel-sel kanker tidak dapat dibasmi 100%. Di samping itu pengobatan dengan kemoterapi mempunyai beberapa efek samping bagi penderita, sedangkan pengobatan dengan radiasi sulit menghindarkan terpaparnya sel sehat oleh radiasi [2]. Berdasarkan hal tersebut, saat ini sedang digalakkan penelitian untuk menemukan obat antikanker yang aman dan spesifik membunuh sel kanker. Obat antikanker yang baik adalah yang bersifat selektif yaitu dapat membunuh sel kanker tetapi tidak membunuh sel normal.

Ribosome-inactivating protein (RIP) suatu protein yang ditemukan pada tanaman, diketahui mempunyai aktivitas sitotoksik merusak ribosom

eukariot dan prokariot, terutama pada sub unit besar sehingga tidak mampu mengikat faktor perpanjangan dan menyebabkan sintesis protein terhambat [3]. RIP dapat dibagi menjadi 2 kategori tergantung dari ada tidaknya rantai polipeptida dengan aktivitas lektin. RIP tipe 1 mempunyai satu rantai polipeptida A (A, *active*) dengan aktivitas RNA N-glikosidase dimana rantai tunggal ini sangat serupa satu sama lainnya, sedangkan RIP tipe 2 terdiri dari dua rantai polipeptida (rantai A dan B). Rantai B (*binding*) suatu polipeptida dengan aktivitas lektin yang mampu berikatan dengan reseptor yang mengandung galaktosa pada permukaan sel sehingga memudahkan masuknya rantai A (*active*) ke dalam sitoplasma, yang selanjutnya akan menginaktifkan ribosom. Dua rantai polipeptida ini dihubungkan dengan ikatan disulfida dan ikatan non kovalen lainnya. Model kedua tipe RIP ditampilkan pada Gambar 1.

Berbagai aktivitas yang ditemukan pada RIP menimbulkan harapan ditemukannya obat baru anti kanker [4,5], anti HIV/obat AIDS [6,7] dan obat autoimun yang selektif [3]. Di samping itu, Barbieri et al [3] menuliskan bahwa RIP mempunyai aktivitas sitotoksik yang rendah pada sel sehat.



Gambar 1 Model dua tipe RIP. RIP tipe 1 dan rantai A RIP tipe 2 merupakan polipeptida dengan aktivitas N-glikosidase, sedangkan rantai B merupakan polipeptida dengan aktivitas lektin. Rantai A dan rantai B dihubungkan dengan ikatan disulfida [3]

Sebagian masyarakat Jogjakarta menggunakan air perasan ubi kayu (*M. esculenta*) yang diparut sebagai obat untuk menghilangkan benjolan-benjolan yang ada pada tubuh manusia dan sebagai obat anti infeksi. Senyawa aktif pada fraksi air tersebut diperkirakan adalah *Ribosome-inactivating protein* (RIP). Dalam Astuti et al [8] telah disebutkan bahwa supernatan umbi *M. esculenta* mempunyai aktivitas *Ribosome-Inactivating Protein* (RIP) yaitu memotong DNA superkoil menjadi *nick circular*. Di samping itu, supernatan tersebut bersifat toksik terhadap Myeloma cell line ($LC_{50} = 180,24 \mu\text{g/mL}$) yang diturunkan dari kanker *Multiple Myeloma* dan HeLa cell line ($LC_{50} = 415,55 \mu\text{g/mL}$) yang diturunkan dari kanker leher rahim akibat terinfeksi oleh virus HPV 18, tetapi kurang bersifat toksik terhadap SiHa cell line yang diturunkan dari kanker leher rahim akibat infeksi HPV 16. Oleh karena itu pada penelitian ini akan diuji apakah protein dalam supernatan umbi *M. esculenta* bersifat toksik terhadap sel normal, dalam hal ini sel mononuklear perifer manusia dan Vero cell line yang diisolasi dari ginjal kera hijau. Sel Vero pertama kali diinisiasi oleh Yasamura dan Kawakita pada 1962 di Universitas Chiba, Jepang. Karakteristik dari sel ini adalah merupakan sel kontinyu, mempunyai morfologi fibroblastik, tergolong aneuploid dan pertumbuhannya terus-menerus dalam kultur sel [9].

METODE PENELITIAN

Bahan yang Digunakan

Umbi ubi kayu (*M. esculenta*) dari daerah Sumber Arum, Moyudan, Sleman, DIY, sel normal mononuklear dan Vero cell line (ATCC), bahan untuk isolasi protein dari ubi kayu : 5 mM buffer kalium fosfat pH 7,2 yang mengandung 0,14 M natrium klorida (Merck), bahan uji sitotoksitas media kultur (Gibco) : 89 % RPMI, 1 % penstrep, 10% FBS, larutan MTT [10] : MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida (Sigma) dilarutkan dalam PBS dengan konsentrasi 5 mg/ml, larutan pelarut formazan [11] : 10% SDS dalam 0,01 N asam klorida, Media penumbuh vero cell line terdiri atas M199 (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) 10,00% (Gibco), penisillin-streptomisin 1,00% (Gibco), fungison 0,50% (Gibco). Bahan untuk isolasi sel mononuklear terdiri atas RPMI 1640 (Gibco) dan *Ficoll histopaque*. Selain yang disebut di atas semua bahan dari Merck.

Alat yang Digunakan

Alat pH meter Metrohm 691, lampu UV Flowgen, Elisa reader Multiskan titertek MCC/340, spektrofotometer UV-Vis Beckman DU-65, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu-160A, lemari pendingin -80°C Gallenkemp, inkubator CO_2 Jouan IG150, laminar air flow cabinet Gelman Science seri BH, mikroskop fase kontras Reichert-Jung

Cara Penelitian

Preparasi sampel ekstrak kasar (crude extract)

Ubi segar 100 g diiris tipis, diblender dan selanjutnya kandungan protein diekstraksi dengan larutan bufer kalium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung NaCl 0,14 M. Setelah diaduk teratur pada 4°C selama 15 jam, ekstrak disaring. Filtrat disentrifuge pada 4000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan dan digunakan sebagai ekstrak kasar protein. Kadar protein ekstrak kasar ditentukan dengan UV-Vis Spektrofotometer dan didapat kadar 4,45 mg/mL.

Isolasi sel mononuklear normal

Sel mononuklear diisolasi dari dari darah perifer menggunakan metode isopaque Ficoll (*Ficoll Isopaque Method*). Darah orang sehat diambil 10 mL menggunakan venoject berheparin, dibolak-balik dan didiamkan sejenak sampai terjadi pemisahan serum. Pemisahan serum dari sel-sel darah merah

secara sempurna dilakukan dengan sentrifugasi 275 G, pada temperatur 4°C selama 5 menit. Sel-sel darah selanjutnya diencerkan menggunakan RPMI yang mengandung penstrep 1% dengan perbandingan 1 : 1 (V/V), kemudian ditambahkan larutan *Ficoll Isopaque* dengan perbandingan 1 : 1 (volume) dan disentrifus pada 725 G, temperatur 4°C selama 10 menit. Selanjutnya akan terjadi pemisahan 3 lapisan yaitu lapisan paling atas RPMI, lapisan tengah *Ficoll* dan paling bawah adalah sel-sel darah merah. Di antara lapisan RPMI dan *Ficoll* terdapat lapisan tipis *Buffy coat* yang berisi sel mononuklear. Lapisan *Buffy coat* ini diambil dan dicuci beberapa kali dengan RPMI yang mengandung penstrep 1%, disentrifus pada 725 G, temperatur 4°C selama 10 menit. Endapan yang berisi sel mononuklear diambil dan dilarutkan dalam media kultur.

Uji sitotoksitas ekstrak kasar terhadap Vero cell line

Uji sitotoksitas dilakukan dalam pelat 96 sumuran. Setiap sumuran dimasukkan 100 μ L media M199 yang mengandung penstrep 4,00%, 100 μ L supernatan dengan dengan dilusi seri jumlah protein 750,00; 375,00; 187,50; 93,75; 46,88; 23,44; 11,72; 5,86; 2,93; 1,47; 0,73; 0,37 μ g/mL, kemudian ditambahkan 100 μ L suspensi sel dalam media kultur dengan jumlah sel 5×10^4 . Sebagai blangko digunakan dilusi seri bufer kalium fosfat 5 mM pH 7,2. Sumuran yang tersisa digunakan untuk (i) kontrol positif yang berisi 100 ml media RPMI yang mengandung penstrep 2% dan 100 mL suspensi sel, (ii) kontrol negatif yang hanya berisi media RPMI. *Plate* diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam aliran CO₂ 5%, kemudian ke dalam setiap sumuran ditambahkan 5 μ L MTT 5 mg/mL, 50 μ L media kultur dan diinkubasi pada 37°C minimal 5 jam dalam aliran CO₂ 5%. Setelah itu ditambahkan SDS 10% dalam HCl 0,1N sebanyak 100 μ L setiap sumuran,

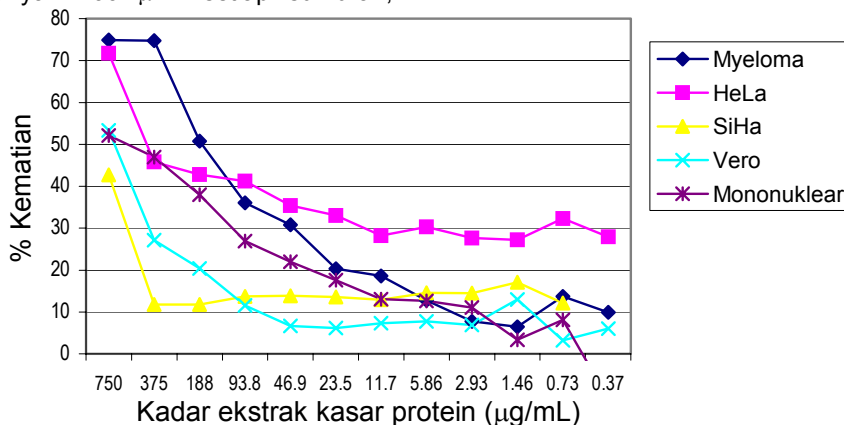
dilanjutkan dengan inkubasi pada 37°C selama 12 jam dalam aliran CO₂ 5%. Serapan dibaca dengan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 540 nm.

Analisis Hasil

Absorbansi kultur sel dalam *plate* 96 sumuran dibaca dengan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 540 nm dan ditentukan persen kematian sel. Dari data tersebut dibuat grafik jumlah sel lawan persen kematian untuk masing-masing *cell line*, kemudian ditentukan nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration*) dengan rumus Reed-Muench.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagian besar RIP yang telah ditemukan diketahui mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil menjadi *nicked circular* dan linear, sehingga uji aktivitas ini dapat digunakan sebagai penapisan keberadaan RIP pada suatu tanaman [12]. Hasil uji aktivitas pemotongan DNA pUC18 superkoil oleh supernatan *M. esculenta* Crantz terlihat terjadi penipisan pita DNA superkoil dan penebalan pita *nicked circular*. Uji sitotoksitas supernatan umbi *M. esculenta* terhadap Myeloma, HeLa dan SiHa *cell line* didapatkan hasil bahwa kadar protein tertinggi yaitu 740 μ g/mL menyebabkan kematian sel myeloma 74,88%, sel HeLa 71,73% dan sel SiHa 42,72% Dari data persen kematian Myeloma dan HeLa *cell line* didapatkan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀) yaitu kadar yang menyebabkan kematian sel sebanyak 50%, sedangkan untuk SiHa *cell line* tidak dapat ditentukan nilai LC₅₀ nya karena kadar tertinggi supernatan umbi *M. esculenta* menyebabkan kematian sel kurang dari 50% populasi [8]. Tabel 1 menunjukkan persen kematian sel normal Vero dan sel mononuklear normal manusia dibandingkan dengan sel kanker Myeloma, HeLa dan SiHa.



Gambar 1 Grafik persen kematian sel normal Vero dan sel mononuklear normal manusia dibandingkan sel kanker Myeloma, HeLa dan SiHa *cell line* karena adanya supernatan umbi *M. esculenta*.

Tabel 1 Persen kematian sel normal Vero dan sel mononuklear normal manusia dibandingkan dengan sel kanker Myeloma, HeLa dan SiHa *cell line* pada uji sitotoksitas supernatan umbi *M. esculenta*

Kadar protein ($\mu\text{g/mL}$)	Persen kematian rata-rata				
	Myeloma <i>cell line</i>	HeLa <i>cell line</i>	SiHa <i>cell line</i>	Vero <i>cell line</i>	Sel mononuklear
750,00	74,88	71,73	42,72	53,35	52,15
375,00	74,73	45,79	11,76	27,13	46,94
187,50	50,75	42,80	11,76	20,37	38,02
93,75	36,05	41,21	13,74	11,56	26,91
46,87	30,83	35,41	13,84	6,65	21,94
23,45	20,35	33,02	13,58	6,16	17,59
11,72	18,61	28,23	12,90	7,31	13,06
5,86	12,77	30,32	14,59	7,76	12,67
2,93	7,79	27,68	14,52	6,90	11,05
1,46	6,48	27,19	17,12	12,97	3,41
0,73	13,75	32,29	12,12	3,25	8,09
0,37	9,90	27,92	-	6,00	-10,7

Tabel 2 Harga LC_{50} sel normal Vero, sel mononuklear normal manusia, Myeloma, HeLa dan SiHa *cell line* pada uji sitotoksitas supernatan umbi *M. esculenta*

Nilai pengamatan	Myeloma <i>cell line</i>	HeLa <i>cell line</i>	SiHa <i>cell line</i>	Vero <i>cell line</i>	Sel mononuklear
LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	180,24	415,55	-	686,00	564,00

Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa supernatan umbi *M. esculenta* relatif toksik terhadap sel normal Vero *cell line* maupun sel mononuklear manusia, dibandingkan dengan HeLa dan SiHa *cell line* yang diturunkan dari sel kanker leher rahim. Hal tersebut mungkin disebabkan karena pada *Manihot esculenta* Crantz yang termasuk famili *Euphorbiaceae* mengandung RIP tipe 2 di mana RIP tipe 2 lebih toksik jika dibandingkan dengan RIP tipe 1. Hal ini sesuai dengan pernyataan Barbieri et al [3] yang menyatakan bahwa tanaman *Euphorbiaceae* merupakan satu-satunya tanaman yang mengandung baik RIP tipe 1 maupun RIP tipe 2. RIP tipe 2 mempunyai rantai polipeptida dengan aktivitas lektin yang akan berikatan dengan reseptor yang mengandung galaktosa pada permukaan sel sehingga akan memudahkan masuknya RIP ke dalam seldan menginaktifkan ribosom. Dengan melihat harga LC_{50} (Tabel 2) dapat dilihat bahwa supernatan umbi *M. esculenta* mempunyai aktivitas sitotoksik tertinggi terhadap Myeloma *cell line* dengan harga LC_{50} sebesar 180,24 $\mu\text{g/mL}$ dan relatif bersifat toksik terhadap sel normal mononuklear manusia dengan harga $LC_{50} = 564,00 \mu\text{g/mL}$, Vero *cell line* dengan harga $LC_{50} = 686,00 \mu\text{g/mL}$, HeLa *cell line* dengan LC_{50}

415,55 $\mu\text{g/mL}$, tetapi kurang bersifat toksik terhadap SiHa *cell line*.

KESIMPULAN

Supernatan umbi *M. esculenta* paling toksik terhadap Myeloma *cell line* dan relatif bersifat toksik terhadap HeLa, dan Vero *cell line* maupun sel mononuklear perifer manusia, tetapi kurang bersifat toksik terhadap SiHa *cell line*.

DAFTAR PUSTAKA

- Haryana, S.M., 1999, *Pemeriksaan Sitogenik, Biologi Molekuler dan Imunologi Sebagai Sarana Deteksi Dini dan Kriteria Faktor Prognostik Mutakhir Penderita Kanker*, Prosiding Seminar Teknologi Kedokteran, FK-UGM, Jogjakarta
- Pharmd, S.D.U, 2002, *Anticancer Drugs*, HealthAtoz.com
- Barbieri, L., Batteli, M.G., and Stirpe, F., 1993, *Biochem. Et Biophys. Acta*, 10, 405-410, 1154, 237-271
- LaCasse, E.C., Bray, M.R., Patterson, B., Lim, W.M., and Perampalan, S., 1999, *Blood*, 94, 2901-2910
- Ferens, W.A., and Hovde, C.J., 2000, *Infection and Immunity*, 68, 4462-4469

6. Lee-Huang, S., Kung, H., and Huang, P.L., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12208-12212
7. Au, T.K., Collins, R.A., and Lam, T.L., 2000, *FEBS Lett*, 471, 169-172
8. Astuti, E., Matsjeh, S., Haryadi, W., Pranowo, D., Puspita, R., Khasanah, L., dan Yuliana, R., 2003, *Selektivitas Sitotoksik Supernatan Umbi Manihot Esculenta Crantz Dengan Aktivitas Ribosome-Inactivating Protein Terhadap Myeloma, HeLa Dan Siha Cell Lines*, Prosiding Seminar Nasional Kimia XII, Jogjakarta
9. Anonim, 2003, Vero [http : //Square.Umin.Ac.JP/miura/Cell.Div./vero/](http://Square.Umin.Ac.JP/miura/Cell.Div./vero/), diakses pada tanggal 15 Mei 2003
10. Mosmann, T., 1983, *J. Immunological Methods*, 65, 55-63
11. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K., 1986, An Improved Colorimetric Assay for Interleukin 2, *J. Immunological Methods*, 93, 157-166
12. Li, M.X., Yeung, H.W, and Pan, L.P., 1991, *Nucleic Acid Res.*, 19, 6309-6312