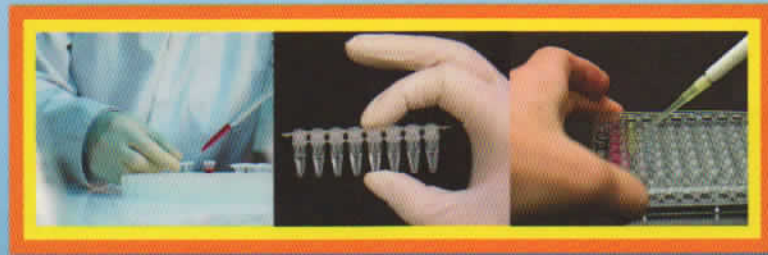


PROSIDING

Annual Scientific Meeting
POKJA NUTRIGENOMIK

SEMINAR NASIONAL PERAN ANTIOKSIDAN DALAM PENANGANAN PENYAKIT DEGENERATIF

DENGAN PENDEKATAN NUTRIGENOMIK
Yogyakarta, 28 Maret 2015



BAGIAN BIOKIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA

Prosiding

"Peran Antioksidan dalam Penanganan Penyakit Degeneratif dengan Pendekatan Nutrigenomik"

Penulis:

Ahmad Hamim Sadewa, dkk

Reviewer:

Dr. Sunarti, M.Kes

Harry Freitag LM, S.Gz., M.Sc., Dietisien

dr. Arta Farmawati, Ph.D

Ukuran Buku : 15 x 21 cm

Tebal Buku : 171 + v halaman

ISBN : 978-602-70556-2-9

Penerbit:

Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran

Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta

Alamat Penerbit:

Gedung Radiopoetro lantai 6, Jl. Farmako, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Telp. 0274-6492446 Fax. 0274-561196

E-mail: bb.fk@ugm.ac.id

KATA PENGANTAR

Prevalensi penyakit degeneratif terus meningkat secara signifikan terutama pada dekade terakhir ini. Penyakit degeneratif seperti diabetes mellitus tipe 2, hipertensi, hiperlipidemia, dan hiperkolesterolemia bersifat multifaktorial. Beberapa faktor risiko penyakit degeneratif adalah pola hidup yang tidak sehat, diet tinggi lemak jenuh, rendah serat, obesitas, dan paparan polutan maupun radiasi. Pemahaman peran diet dalam pencegahan dan terapi penyakit degeneratif saat ini banyak diteliti dan telah menghasilkan beberapa rekomendasi diet untuk mengatasi penyakit degeneratif.

Saat ini juga banyak dikembangkan pangan fungsional untuk meningkatkan status kesehatan. Pangan fungsional juga dapat digunakan untuk mencegah atau mengurangi risiko terhadap penyakit degeneratif. Peran pangan fungsional ini salah satunya terletak pada nutrisi serta senyawa bioaktif yang dikandungnya. Kandungan tersebut dapat mempengaruhi ekspresi gen yang akhirnya akan mempengaruhi proses biokimiawi dalam tubuh.

Pemahaman bagaimana nutrisi dapat mempengaruhi ekspresi gen dan proses dalam tubuh dipelajari dalam bidang ilmu nutrigenomik. Berdasarkan riset nutrigenomik akan diketahui senyawa-senyawa bioaktif dalam makanan yang dapat meningkatkan status kesehatan, mencegah atau menunda penyakit bahkan mengenali resiko penyakit terkait nutrisi.

Pada hari peringatan HUT RSUP dr. Sardjito ke-33 dan *Dies Natalis* Fakultas Kedokteran ke-69, Pokja Nutrigenomik FK UGM telah berhasil menyelenggarakan seminar dengan tema "Peran Antioksidan dalam Penanganan Penyakit Degeneratif dengan Pendekatan Nutrigenomik" yang merupakan salah satu rangkaian acara *Annual Scientific Meeting 2015*. Seminar tersebut berhasil merangkul para peneliti, dosen, dan mahasiswa dari berbagai disiplin ilmu untuk berkumpul memaparkan hasil-hasil penelitian mereka terkait nutrigenomik. Tujuan dari seminar tersebut adalah untuk saling bertukar pengetahuan dan gagasan di bidang Nutrigenomik, serta memperkuat jaringan dan kolaborasi antar peneliti di berbagai wilayah di Indonesia. Setelah mengikuti seminar ini, diharapkan peserta seminar terpacu melakukan riset nutrigenomik dalam usaha membantu penanganan penyakit degeneratif di Indonesia.

Kami ingin menyampaikan terima kasih dan apresiasi kepada seluruh penulis yang tergabung dalam prosiding ini, pembicara seminar, peserta presentasi oral dan poster, peserta seminar, seluruh panitia yang terlibat, serta kepada para kolega yang telah berkontribusi menyukseskan seminar ini. Kami berharap semua yang terlibat di dalam seminar ini mendapatkan banyak manfaat.

Dr. Dra. Sunarti, M.Kes
Reviewer

Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Buah Makasar (*Brucea javanica* L Merr) dan Ubi Rambat (*Ipomea batatas* L) Terhadap Sel Raji

Dwi Sutiningsih, Sri Yuliatwati

Bagian Epidemiologi dan Penyakit Tropik
Fakultas Kesehatan Masyarakat Undip Semarang

E-mail : dwisuti98@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara. Usaha menemukan antikanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanol buah makasar (*Brucea javanica* L Merr) dan ubi rambat (*Ipomea batatas* L) terhadap sel Raji.

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental murni dengan pendekatan *post test by control group design*. Pada *microplate* 96 sumuran yang mengandung 100 μ L sel uji dengan kerapatan 2×10^4 , ditambahkan 100 μ L ekstrak etanol buah makasar dan ubi rambat pada berbagai peringkat konsentrasi (100; 50; 25; 10; 5; dan 1 μ g/mL) secara triplikat. Kontrol menggunakan media kultur yang dianggap memiliki pertumbuhan 100%. Kultur yang mengandung bahan uji selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran dihitung jumlah sel yang hidup dengan menggunakan *tripan blue*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertinggi ekstrak etanol ubi rambat yaitu 100 μ g/mL diperoleh prosentase kematian sel sebesar 84,44%, dengan nilai IC₅₀ sebesar 25,71 μ g/mL. Pada pemberian ekstrak etanol buah makasar pada konsentrasi 100 μ g/mL diperoleh nilai prosentase kematian sebesar 93,07% dengan nilai IC₅₀ sebesar 17, 83 μ g/mL. Efek sitotoksik ekstrak etanol buah makasar (*B. javanica* L Merr) terhadap sel Raji lebih tinggi dibanding ekstrak etanol ubi rambat (*I. batatas* L).

Kata kunci: sitotoksisitas, *Brucea javanica*, *Ipomea batatas*, sel Raji

PENDAHULUAN

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO), disebutkan bahwa 12% kematian yang terjadi dari 50 juta kematian dalam tahun 2007 disebabkan oleh kanker. Sebesar dua pertiga dari jumlah tersebut terjadi di negara berkembang.¹ Lebih jauh dilaporkan oleh *America Cancer Society* sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker.²

Menurut WHO (2008), kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler di antara penyakit tidak menular (*non communicable disease/NCD*). Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara.³ Kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker serviks dengan frekuensi relative 29,63%.⁴

Berbagai cara penyembuhan telah dilakukan untuk melawan kanker seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi dan

imunoterapi, namun masing-masing cara mempunyai kelemahan masing-masing sehingga pengobatan kanker belum memuaskan hingga saat ini.⁵ Obat anti kanker yang ideal seharusnya dapat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan sehat, tetapi sampai saat ini belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria demikian, sehingga penggunaan klinik harus dengan pertimbangan untung dan rugi yang baik. Penggunaan kemoterapi anti kanker belum memberikan hasil optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik dan menimbulkan efek samping.⁶ Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya sel kanker yang resisten terhadap anti kanker tersebut yang membuat anti kanker tersebut tidak sensitif lagi. Dengan demikian usaha menemukan anti kanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan.

Salah satu upaya yang sudah dirintis sejak jaman dulu adalah pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan zat atau unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat anti kanker. Beberapa tanaman obat di antaranya telah digunakan secara empiris oleh masyarakat secara tradisional untuk mengobati kanker, misalnya buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr) dan ubi rambat (*Ipomea batatas* (L.)).⁷ Tanaman-tanaman tersebut mengandung golongan senyawa aktif yang diduga mempunyai aktivitas sitotoksik (anti kanker) seperti bruceantin,

bruceantinol dalam *B. javanica* (L.) Merr, dan *ipomeanol* dalam *I. batatas*. Namun demikian bukti ilmiah mengenai mekanisme anti kanker tanaman tersebut belum banyak diungkapkan.

Penelitian untuk mengkaji aktivitas anti kanker dari tanaman yang diduga mempunyai khasiat anti kanker penting dilakukan dalam usaha mencari dasar ilmiah penggunaan tanaman tersebut untuk pengobatan kanker pada masyarakat. Uji sitotoksik perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas biologis ekstrak etanol *Brucea javanica* (L.) Merr dan *Ipomea batatas* (L.) terhadap sel kanker, sehingga diketahui kemampuannya sebagai anti kanker serta untuk memperkirakan dosis yang akan digunakan.

METODE DAN BAHAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium dengan pendekatan *post test by control group design*. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah makasar (*B.javanica* L. Merr) dan daun ubi rambat (*I.batatas* L.), RPMI 1640 (Gibco), *Fetal Bovine Serum*/FBS (Gibco), *peniciline-streptomycin* (Gibco), NaHCO₃ (E. Merck), HEPES (Sigma), tripsin (Gibco), akuades, fungison (Gibco), MeOH(E. Merck), dan sel Raji. Sel Raji merupakan *continous cell line* yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel Raji diturunkan dari sel epitel kanker leher

rahim (serviks) manusia. Sel ini diisolasi tahun 1951 dari seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks, berusia 30 tahun. Sel Raji cukup aman digunakan untuk penelitian dan kepentingan kultur sel.⁶

Sedangkan alat-alat yang digunakan meliputi seperangkat alat ekstraksi, *laminar air flow* (Nuarie), *tissue culture flask*/TCF 25cm² (Nunclone), *microplate* 96 sumuran (Nunclone), inkubator (Nuarie), mikroskop kontras (Olympus Japan), sentrifus (B. Braun Biotech Internasional), timbangan elektrik (Sartorius), mikropipet (Socorex), hemositometer (Newbaur), dan filter diameter 0,2 um (Labec).

Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Makasar dan Ubi Rambat

Bahan uji yang diperoleh dibersihkan, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung. Dari hasil pengeringan ini dilanjutkan dengan pengeringan di oven, kemudian diserbuk dengan blender dan diayak untuk memperoleh serbuk tanaman uji. Pembuatan ekstrak ini dilakukan dengan cara maserasi terhadap bahan uji dengan cara sebagai berikut: lebih kurang 50 gram serbuk bahan uji, dimasukkan dalam bejana erlenmeyer, kemudian dituangi 250 gram bagian cairan penyari (etanol), ditutup dan dibiarkan 24 jam terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk pada suhu kamar. Setelah 24 jam pertama diserakai, ampas diperas, filtrat ditampung, maserasi

diulang tiga kali dengan menambahkan cairan penyari secukupnya ke dalam ampas yang diperoleh, demikian diulangi hingga diperoleh filtrat terakhir sudah jernih. Filtrat yang ditampung dalam bejana selanjutnya diuapkan ke dalam cawan dengan menganginkan sampai diperoleh ekstrak kental atau hampir kering. Pada akhirnya masing-masing ekstrak masih dievaporasi di dalam *freeze dryer vaccum* hingga diperoleh ekstrak kering. Selanjutnya disimpan di lemari es suhu -20°C.

Uji Sitotoksik

Sebelum dilakukan uji sitotoksik, sel Raji ditumbuhkan dalam medium RPMI 1640 yang ditambahkan NaHCO₃ 2 gram, HEPES 2 g dan disuplai dengan FBS 10%, penisilin-streptomisin 3, fungison 1%. Kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C hingga konsentrasi sel mencapai konfluen dan siap untuk digunakan dalam penelitian.

Pada *microplate* 96 sumuran yang mengandung 100 µL sel uji dengan kerapatan 2 x 10⁴, ditambahkan 100 µL ekstrak etanol buah makasar dan ubi rambat pada berbagai peringkat konsentrasi (100, 50, 25, 5, dan 1 µg/mL) secara triplikate. Sebagai kontrol digunakan media kultur yang dianggap memiliki pertumbuhan 100% (Sel + media RPMI 1640 kultur).

Kultur yang mengandung bahan uji selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi,

masing-masing sumuran dihitung jumlah sel yang hidup dengan menggunakan *tripan blue*. Dari setiap sumuran diresuspensi lebih dahulu kemudian diambil 10 μ L sel uji, masukkan dalam tabung *ependoff*, tambahkan 50 μ L *tripan blue* 0,5%, dan campur secukupnya. Dari campuran sel tersebut ambil 10 μ L, masukkan dalam hemositometer dan hitung jumlah sel yang hidup di bawah mikroskop cahaya.

Efek sitotoksik dianalisis dengan analisa probit, ditentukan nilai IC_{50} dari masing-masing senyawa yaitu kadar yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel tumor hingga 50%. Harga rata-rata IC_{50} dan jumlah sel yang hidup pada berbagai waktu pengamatan dianalisis statistik dengan menggunakan uji *t* independent dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sitotoksitas Ekstrak Etanol Buah Makasar (B.javanica L Merr) dan Ubi Rambat (I. batatas L) terhadap Sel Raji.

Pada uji sitotoksitas ini digunakan metode penghitungan sel secara langsung menggunakan bantuan pewarnaan bitu tripan (*tripan blue*), yang mendasarkan pada prinsip bahwa sel yang mati telah kehilangan integritas membran selnya, sehingga biru tripan dapat masuk ke dalam sel. Dengan demikian sel yang mati akan menyerap warna biru, sedangkan sel yang hidup tidak menyerap warna biru.⁹ Rata-rata

jumlah sel Raji yang hidup setelah pemberian ekstrak buah makasar (*B.javanica*) dan ubi rambat (*I.batatas*) pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Pada percobaan uji sitotoksitas ini ditentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel kanker hingga 50%, hal ini menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel Raji. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin toksik suatu senyawa.

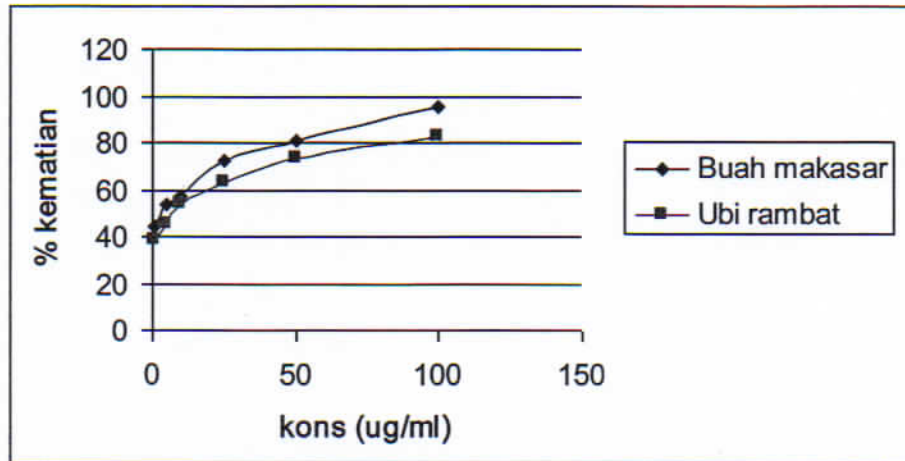
Pada konsentrasi tertinggi ekstrak etanol ubi rambat yaitu 100 μ g/mL diperoleh prosentase kematian sel sebesar 82,22%, dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol ubi rambat terhadap sel Raji adalah 135,09 μ g/mL. Pada pemberian ekstrak etanol Buah makasar konsentrasi tertinggi yaitu 100 μ g/mL diperoleh nilai prosentase kematian sebesar 95,56% dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol buah makasar terhadap sel Raji adalah 21,03 μ g/mL. Nilai IC_{50} ekstrak etanol buah makasar lebih kecil daripada nilai IC_{50} ekstrak etanol ubi rambat, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah makasar lebih toksik terhadap sel Raji dibandingkan dengan ekstrak etanol ubi rambat. Hal ini kemungkinan karena ekstrak etanol buah makasar banyak mengandung bruseantin yang merupakan senyawa aktif tanaman buah makasar yang dikenal mempunyai aktivitas anti kanker dan bersifat sitotoksik pada *cell line*, sedangkan

Tabel 1. Rata-rata jumlah sel Raji yang hidup dan prosentase kematian sel Raji setelah pemberian ekstrak etanol buah makasar (*B. javanica*) pada berbagai konsentrasi

Kons. ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah sel yang hidup $\times 10^4$								% Kematian
	Ekstrak Buah Makasar				Kontrol				
	I	II	III	Rata-rata	I	II	III	Rata-rata	
100	3	1,5	1,5	2	45	47	43	45	95,556
50	4	12	9	9	42	54	45	47	80,851
25	6	15	13,5	13	45	48	42	45	72,222
10	13	15	18	18	47	36	39	40,7	56,967
5	16	24	25,5	25	37	51	53	52,7	53,481
1	30	34,5	36	34	63	63	54	60	44,167

Tabel 2. Rata-rata jumlah sel Raji yang hidup dan prosentase kematian sel Raji setelah pemberian ekstrak etanol ubi rambat (*I. batatas*) pada berbagai konsentrasi

Kons. ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah sel yang hidup $\times 10^4$								% Kematian
	Ekstrak Ubi Rambat				Kontrol				
	I	II	III	Rata-rata	I	II	III	Rata-rata	
100	10,5	7,5	6	8	45	47	43	45	82,222
50	10,5	15	12	13	42	54	45	47	73,404
25	16,5	18	15	17	45	48	42	45	63,333
10	18	19,5	19,5	19,5	47	36	39	40,7	53,279
5	28,5	30	28,5	29	37	51	53	52,7	44,937
1	37,5	36	37,5	37	63	63	54	60	38,333



Gambar 1. Grafik hubungan antara konsentrasi dengan prosentase kematian sel Raji setelah pemberian ekstrak etanol ubi rambat dan buah makasar

ekstrak etanol ubi rambat mengandung senyawa aktif *Ipomeanol* yang diduga sebagai anti kanker.¹⁰ Kemungkinan kedua senyawa aktif tersebut mampu menghambat proliferasi sel kanker dengan

cara menghambat gen-gen atau protein-protein yang mengatur pembelahan sel pada siklus sel dan mungkin menghambat sinyal transduksi melalui penghambatan sinyal pertumbuhan atau melalui

penghambatan *cell cycle progression* dengan menghambat protoonkogen seperti CycD, cdk 4/6, c-myc, atau mampu mengaktifkan tumor supresor seperti caspase 3/8/9, p53, pRb dan inaktivasi Bcl2. Grafik hubungan antara konsentrasi dengan prosentase kematian sel Raji ditunjukkan pada Gambar 1.

Pada grafik terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol ubi rambat dan buah makasar semakin tinggi prosentase kematian sel Raji (Gambar 1). Perhitungan statistik menunjukkan bahwa prosentase kematian sel Raji pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol ubi rambat dan buah makasar menunjukkan jumlah kematian yang berbeda ($p < 0,05$).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah makasar dan ekstrak etanol ubi rambat memiliki efek sitotoksik terhadap sel Raji. Uji sitotoksitas membuktikan bahwa efek sitotoksik ekstrak etanol buah makasar (*B.javanica* L Merr) terhadap sel Raji lebih tinggi dibanding ekstrak etanol ubi rambat (*I. batatas* L).

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization, 2008, *The World Health Report: Live in the 21st Century, A Vision for All*, WHO, Geneva.
2. Anonim, 2005, *Cancer Basic Fact: Cancer Fact & Figures, America Cancer Society* revised 1/1995.
3. King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nded., Pearson Education Limited, London
4. Prajatmo Heru, Hakimi, M. & Sofowan, S., 2009, Survival Rate of Cervical Cancer Patient in Province of Yogyakarta, *Indon J Clin Epidemiol Biostat.* 6(3):4-8
5. Hoffman, E.J.m 2009, *Cancer and the Search for Selective Biochemical Inhibitors*, CRC Press, Boca Raton, London
6. Riasititi Y. 2004., Pengaruh Ekstrak Etanol Buah Makasar (*Brucea javanica*) terhadap Proliferasi dan Apoptosis Sel Ca Colon [thesis], Program Pasca Sarjana: Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
7. Agoes, A., Halimi E.S., Djafar, Z.R. & Kamaluddin, M.T., 2000, Studi pengobatan dan jenis ramuan tanaman obat di Propinsi Sumatera Selatan, *Majalah Kedokteran Sriwijaya (MKS).* 32(1): 1-5
8. Freshney, R.I., 1986, *Animal cell Culture, A Practical Approach*, IRL Press Washington DC.
9. Yohana, Arisandi dan Yovita Andriani, 2005, *Khasiat Tanaman Obat*, Pustaka Buku Murah, Jakarta.
10. Nichenametla SN, et al. 2006. A Review of the Effects and Mechanism of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 46:161-183.