

Linamarase

by Fatmawati Fatmawati

Submission date: 07-Apr-2022 11:21AM (UTC+0700)

Submission ID: 1804015360

File name: Uji_aktifitas_sitotoksik_Linamarase.docx (55.7K)

Word count: 2568

Character count: 15283

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK LINAMARASE/LINAMARIN DARI FRAKSINASI UBI KAYU (*Manihot esculenta Crantz*) TERHADAP SEL KANKER MANUSIA

Kusumo Hariyadi¹, Fatmawati¹, Dalilah²

¹Bagian Biokimia FK Unsri, Palembang, Indonesia

²Bagian Parasitologi FK Unsri, Palembang, Indonesia

Abstrak

Umbi casava beracun dikeringkan hingga kadar air mencapai sekitar 3%, dibuat serbuk kemudian dimaserasi berturut-turut dengan n-heksana, etil asetat dan etanol-air, masing-masing ekstrak dikeringkan dengan destilasi vakum. Hanya ekstraksi dengan pelarut etanol-air yang menghasilkan ekstrak, sedangkan n-heksana dan etil asetat tidak menghasilkan ekstrak. Selanjutnya fraksi yang memiliki nilai IC_{50} tertinggi kesatu dan kedua dilanjutkan dengan fraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel akan diperoleh beberapa fraksi yang lebih spesifik yang diharapkan linamarin akan terkonsentrasi dan dilakukan penapisan fitokimia. Selanjutnya linamarin yang terkonsentrasi diuji efek sitotoksiknya terhadap sel kanker manusia yaitu kanker servik HeLa. Diukur nilai IC_{50} nya dibanding kontrol positif doksorubicin. Sel HeLa sebanyak 2×10^4 sel/100 μ L untuk setiap sumuran sebanyak 288 sumuran yang terbagi pada 3 plate pada medium komplit (MK), konsentari ekstrak ubi kayu 125 μ g/mL sampai 4000 μ g/mL, doksorubin (kontrol positif) 1,5 μ g/mL sampai 50 μ g/mL dengan sumuran pada plate 1 (ekstrak 12 konsentrasi, DMSO 6 konsentrasi dan doksorubisin 6 konsentrasi), pada plate 2 (ekstrak 12 konsentrasi) dan pada plate 3 (DMSO 6 konsentrasi dan doksorubisin 6 konsentrasi). Hasil IC_{50} untuk ekstrak ubi kayu sebesar 2553,296 μ g/mL dan doksorubisin 15,691 μ g/mL. Kekuatan sitotoksik dari ekstrak ubi kayu $1/162$ x kekuatan sitotoksik doksorubisin. Terlihat adanya kesesuaian antara gambaran mikroskopik dengan preparate diperbesar 200x dengan IC_{50} yang diukur dengan Elisa Reader model 680 XR microplate reader S/N 00000 terdapat perbedaan yang besar dan hal ini bukan opoptosis (kematian sel) tetapi ekstrak ubi kayu tersebut memberi efek proliferasi pada pertumbuhan sel kanker HeLa. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak ubi kayu mempunyai efek sitotoksik ditunjukkan dengan kemampuan ekstrak ubi kayu dapat membunuh 50% sel HeLa (IC_{50}) pada konsentrasi 2553,296 μ g/mL. Gambaran mikroskopik pada konsentrasi ekstrak ubi kayu 3000 μ g/mL menunjukkan sebagian (lebih kurang 50%) sel HeLa ada yang mati. Ekstrak ubi kayu hanya sebagai anti proliferaatif karena nilai IC_{50} berbeda jauh dengan kontrol positif doksorubisin.

Kata Kunci : Ubi kayu, Sel HeLa, uji sitotoksik

1. Pendahuluan

Perempuan muda Indonesia di bawah usia 40 tahun berpotensi (*early onset*) menderita

kanker payudara sebesar 26%, sedangkan untuk populasi dunia, prosentase tersebut hanyalah 6%. Faktor resiko yang bisa menyebabkan

kanker payudara, misalnya saja faktor gaya hidup, pola makan, olah raga, faktor berkaitan dengan hormon, ada tidaknya anak, menyusui atau tidak. Yang tidak kalah penting adalah faktor polutan. Ada dua macam kanker payudara, yaitu yang sporadic dan yang hereditas atau keturunan. Semua manusia dalam perjalanan hidupnya memiliki resiko terkena kanker, karena kita selalu terekspos dengan sesuatu yang bisa menyebabkan kanker.¹

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebarannya (metastasis) ke bagian tubuh yang lain. Sifat utama sel kanker ditandai dengan hilangnya kontrol pertumbuhan dan perkembangan sel kanker tersebut.² Setiap tahun jumlah penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang, dua pertiga dari penderita kanker di dunia berada di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia. Data Departemen Kesehatan menunjukkan jumlah penderita kanker di Indonesia mencapai 6% dari populasi.³ Kanker leher rahim (Ca serviks) adalah kanker yang terjadi pada serviks uteri, suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara rahim (uterus) dengan liang senggama (vagina).⁴ Kanker serviks merupakan penyebab kematian akibat kanker yang terbesar pada wanita di negara-negara berkembang, bahkan tiap tahunnya sekitar seperempat juta wanita meninggal karena penyakit ini.⁵

Obat antikanker yang ideal seharusnya cepat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan sehat. Akan tetapi, sampai sekarang belum ditemukan obat-obatan dengan kriteria demikian. Selain efek sampingnya yang relatif besar, harga obat-obatan tersebut juga mahal sehingga sulit dijangkau oleh sebagian besar masyarakat di Indonesia. Usaha untuk mengobati penyakit kanker dengan obat tradisional semakin banyak dilakukan karena alasan biaya yang lebih murah, lebih mudah didapat, efek samping yang relatif kecil, dan dapat diramu sendiri.⁶

Keanekaragaman hayati di Indonesia sangat berpotensi dalam penemuan senyawa baru yang

berkhasiat sebagai antikanker, salah satunya tanaman yang digunakan adalah genus Piper. Komponen yang menimbulkan efek toksik pada tanaman piper adalah piperin. Piperidin yang terdapat dalam piperin merupakan salah satu senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antikanker.⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Piper longum* diketahui mempunyai efek toksik terhadap sel DLA (*Dalton's Lymphoma Ascites*) dan sel EAC (*Ehrlich Ascites Carcinoma*). Nilai LD₅₀ ekstrak alkohol *piper longum* sebesar 500 ig/mL untuk sel DLA dan 250 ig/mL untuk sel EAC.⁸ Selain itu, penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dari buah kemukus (*Piper cubeba* L.) mempunyai efek toksik terhadap sel myeloma dengan dengan nilai IC₅₀ sebesar 76,10 ig/mL.⁹

Linamarase adalah enzim yang dapat mengubah molekul linamarin menjadi glukosa dan asetonitril, selanjutnya asetonitril karena pengaruh pH akan berubah menjadi aseton dan asam sianida. Linamarase dilepas sekitar sel kanker sedangkan pada sel normal tidak mempunyai linamarase.¹⁰ Sianida hasil dari linamarin ini akan memacu membrane mitokondria menjadi membengkak dan mengalami depolarisasi dan berbahaya dan memacu sel mengalami apoptosis kematian yang irreversible.¹¹ Keracunan sianida dapat melalui penghambatan sitokrom oksidase dengan menghambat rantai respirasi, dan dapat menyebabkan hilangnya pengaturan kapasitas transport ion, pH dan bersifat lethal.¹² Molekul glukosa yang mengikat propilsianida akan diubah menjadi glukuronat sehingga diharapkan menghasilkan senyawa yang lebih berpotensi sebagai obat bukan toksin, C₆ dari glukosa dapat dioksidasi tanpa teroksidasinya bagian gugus aldehyd (C₁).¹³

Uji sitotoksitas ekstrak etanol pare, meniran dan sambiloto telah dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan sel secara langsung dengan bantuan pewarnaan biru tripan. Konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan sel hingga 50% (IC₅₀) ditetapkan dengan analisis probit. Penelitian lain terhadap ekstrak daun srikaya

(*Ammona squamosa*) terhadap sel HeLa dengan metode *Brine Shrim Lethaly Test* (BSLT) diperoleh hasil 7,698 ug/mL dengan kontrol positif Sisplatin.¹⁴

Ubi kayu (*Manihot esculenta*) tumbuh banyak dan subur di daerah tropis dan sub tropis dan digunakan sebagai sumber karbohidrat. Di dalam ubi kayu terdapat glukosida cyanogenic yang beracun dan tingkat racunnya tergantung pada kadar glukosida cyanogenic yang dikandungnya.¹⁵ Tepung singkong (tapioka) digunakan sebagai sumber karbohidrat pada makanan. Pengolahan makanan harus diperhatikan toksisitas dari singkong karena mengandung 20 miligram cyanide (CN) perkilogram akar segar ubi kayu. Ubi kayu yang berasa pahit mempunyai toksisitas 50 kali lebih besar sekitar 1 g/kg.

Penelitian ini dilakukan karena belum ada penelitian yang menggunakan ekstrak ubi kayu yang mengandung glukosida cyanogenic sebagai materi uji sitotoksik, dengan pengujian perubahan parameter analitik enzim linamarase tikus yang diinfeksi kanker dan dilakukan uji IC₅₀ ekstrak kasava.

6

2. Metode

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ubi kayu beracun yang diperoleh dari kebun petani daerah Belitang, Kabupaten OKU Timur Sumatera Selatan. Bahan uji in vitro adalah sel kanker manusia servik HeLa (*human ephiteloid cervic carcinoma*), media pertumbuhan sel, laminar air flow, vortex, pipet mikro, mikroskop, sentrifuga, incubator CO₂, plate, hemositometer dan elisa reader.

Cara Kerja

a. Pembuatan ekstrak ubi kayu

Sebanyak 15 kg tepung ubi kayu kering dengan kadar air 5% dimaserasi berturut-turut dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol. Filtrat yang dihasilkan diuapkan dengan penguap destilasi vakum (60°C) hingga diperoleh ekstrak pekat.

b. Persiapan sel HeLa

Media diberi tripsin blue 25 uL, yang mengapung berwarna biru, dipisahkan dari media dengan jalan dituang pada larutan desinfektan. Sel yang menempel di dasar media dilepas dan diberi larutan tripsin, kemudian sel dilepas dari dasar media, selanjutnya disentrifuga 1500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya endapan berisi sel HeLa dipindahkan pada medium kompleks (MK): FBS 10%, Fungison 0,5% dan Penstrep 2%. Ditambah RPMI hingga 100 ml dimasukkan ke incubator CO₂ selama 24 jam. Selanjutnya sel dihomogenkan dengan divortex. Dilakukan penghitungan jumlah sel (setelah 24 jam) dengan hemositometer, apabila terlalu banyak boleh ditambahkan medium MK. Cara menghitung dengan hemositometer :

- Diencerkan suspensi sel sebesar 5x
- Ditetaskan pada 16 kotak baca pada plate hemositometer
- Dibaca pada mikroskop, hasil sebagai berikut:

Kotak 1 berisi 73 sel

Kotak 2 berisi 66 sel

Kotak 3 berisi 107 sel

Kotak 4 berisi 95 sel

Jumlah = 341 sel

Jumlah sel HeLa = $85,25 \times 5 \times 10^4 = 4,2625 \times 10^6$ sel/mL.

Kebutuhan dalam mL =

$4 \text{ juta} / 4,2625 \times 10^6 \text{ sel/mL} \times 1 \text{ mL} = 938 \text{ uL}$.

Jika 100 well = 93.800 uL = 93,8 mL.

Dilakukan dalam Laminar Air Flow aktif (disemprot desinfektan dan lampu spiritus yang menyala dan aliran udara filter aktif).

Ambil 0,938 mL sediaan sel (sebelumnya divortex) + 19,062 mL MK = 20 mL untuk 200 well.

c. Pembuatan konsentrasi larutan ekstrak ubi kayu

Dibuat konsentrasi ekstrak 10.000 ug/mL sebagai larutan induk. Timbang 50 mg ekstrak + 400 uL DMSO + 4600 uL MK, dilarutkan maka konsentrasinya adalah 10.000

ug/mL. Dibuat satu seri larutan ekstrak mulai dari 8000 ug/mL sebanyak 250 ug/mL.

- d. Pembuatan konsentrasi larutan Doxorubicin (kontrol positif)

Larutan induk Doxorubisin 2 mg/mL (2000 ug/mL) sebanyak 5 mL. Dibuat larutan doxorubisin dengan konsentrasi 50 ug/mL, 25 ug/mL, 12,5 ug/mL, 6,25 ug/mL, 3,125 ug/mL dan 1,5 ug/mL.

- e. Uji antiproliferasi dan apoptosis

Disiapkan 3 plate steril dan dimasukkan LAF :

- i. Beberapa sumuran dalam plate diisi dengan 100 uL kultur sel HeLa berisi 2×10^4 sel dengan susunan plate 1, 2 dan 3 diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

- ii. Plate 1 diisi kontrol sel (sel + medium), perlakuan (sel + medium + ekstrak 4000 sd 7,8125 ug/mL), DMSO 1 sd 6, doxorubisin (sel + medium + doxorubisin 50 sd 1,5625 ug/mL)

Plate 2 diisi kontrol sel (sel + medium), perlakuan ekstrak (sel _

medium + ekstrak), kontrol ekstrak (sel + medium + ekstrak), kontrol

medium saja.

Plate 3 diisi kontrol sel (sel + medium), DMSO 1 sd 6 (sel + medium + DMSO), kontrol DMSO (medium DMSO), doxorubisin (sel + medium + doxorubisin), kontrol doxorubisin (medium +

doxorubisin), kontrol medium (medium saja). Ketiga plate dimasukkan inkubator CO₂ selama

24 jam.

- f. Uji aktivitas antiproliferasi dan sitotoksik dilakukan pada kultur sel kanker HeLa menggunakan metode uji tripan biru yang telah dilaporkan oleh Lin & Hwang (1991). Doxorubisin digunakan sebagai kontrol positif dan larutan DMSO sebagai kontrol negatif. Jumlah sel hidup persumuran

dihitung menggunakan alat ELISA Reader Dynatech MR5000 pada panjang gelombang 550 nm.

Nilai IC₅₀ ditentukan dari grafik persen sel hidup vs log konsentrasi sampel, diuji dengan Anova.

3. Hasil

Dari hasil pembacaan Elisa reader model 680 XR Microplate reader S/N 00000 dan dibaca pada filter 550 nm, diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Nilai IC₅₀ pada ekstrak ubi kayu

No	Konsentrasi (ug/mL)	% Penghambatan	IC ₅₀
1	4000	67,443	
2	3000	56,413	
3	2000	46,732	
4	1500	33,169	
5	1000	32,230	
6	500	24,142	2553,296
7	250	22,059	
8	125	17,563	
9	62,5	15,237	
10	31,25	17,198	
11	15,625	13,480	
12	7,8125	17,075	

Tabel 2. Nilai IC₅₀ DMSO dan Doxorubisin

No	Perlakuan	% Penghambatan	IC ₅₀
1	DMSO 1	16,227	
2	DMSO 2	15,864	
3	DMSO 3	13,273	
4	DMSO 4	16,091	
5	DMSO 5	15,818	
6	DMSO 6	13,000	
7	Doxo 50 ug/mL	84,500	
8	Doxo 25 ug/mL	81,318	
9	Doxo 12,5 ug/mL	57,773	
10	Doxo 6,25 ug/mL	53,864	15,691
11	Doxo 3,125 ug/mL	50,682	
12	Doxo 1,5625 ug/mL	52,045	

DMSO sebagai blanko tidak memberikan nilai IC₅₀ dan doxorubisin (kontrol positif) memberikan nilai IC₅₀ sebesar 15,691 ug/mL sedangkan ekstrak ubi kayu memberikan nilai IC₅₀ 2553,296 ug/mL.



Gambar 1. Mikroskopis sel HeLa + Doxorubisin 12,5 ug/mL, memberikan penghambatan 57,773%



Gambar 2. Mikroskopis sel HeLa + Ekstrak 3000 ug/mL, memberikan penghambatan 56,413%.

4. Pembahasan

Dari hasil penelitian diperoleh IC_{50} untuk ekstrak sebesar 2553,296 ug/mL, apabila dibandingkan maka kekuatan sitotoksitas antara ekstrak dengan doxorubisin adalah $2553,296/15,691 = 162x$ atau kekuatan sitotoksik dari ekstrak ubi kayu 1/162 kekuatan sitotoksik doxorubisin.

Dari gambaran mikroskopis ekstrak dengan konsentrasi 3000 ug/mL (sedikit di atas IC_{50}) terlihat adanya pertumbuhan sel HeLa di sekitar 50%, ditandai dengan adanya gambaran sel yang ada semacam serabut disekitarnya dan dinding sel yang menebal. Demikian juga terlihat pada preparat yang diberi doxorubisin 12,5 ug/mL terlihat sebagian sel HeLa sekitar 50%nya dinding selnya menebal.

Terlihat adanya kesesuaian antara gambaran mikroskopis dengan preparate diperbesar 200x dengan IC_{50} yang diukur dengan Elisa reader model 680 XR microplate reader S/N 00000.

Uji sisitotoksisitas ekstrak etanol pare, meniran dan sambiloto dilakukan dengan metode penghitungan sel secara langsung dengan bantuan pewarnaan biru tripan, didapatkan kadar yang mampu menghambat pertumbuhan sel hingga 50% (IC_{50}) adalah 51,56 ug/mL; 87,73 ug/mL dan 79,99 ug/mL.¹⁶ Penelitian terhadap ekstrak daun srikaya (*Annona squamosa*) terhadap selHeLa dengan metode *Brine Shrim Lethaly Test* (BSLT) memperoleh hasil 7,698 ug/mL¹⁴, sedangkan penelitian terhadap ekstrak *A. suberitoides* terhadap aktivitas pertumbuhan sel HeLa dengan metode RAL satu faktorial dengan kontrol positif menggunakan Sisplatin mempunyai IC_{50} sebesar 153,007 ug/mL.¹⁵ Dari beberapa penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya terdapat perbedaan-perbedaan mengenai cara kerja, kontrol positif dan metodenya yang menyebabkan adanya perbedaan hasil nilai IC_{50} yang berbeda mencolok antara peneliti yang satu dengan yang lain sehingga tidak dapat dibandingkan.

Dengan IC_{50} dari ekstrak ubi kayu yang demikian besar 2553,296 ug/mL dan doxorubisin 15,691 ug/mL maka terdapat perbedaan yang besar dan hal ini bukan opoptosis (kematian sel) tetapi ekstrak ubi kayu tersebut memberikan efek proliferasi pada pertumbuhan sel kanker HeLa.

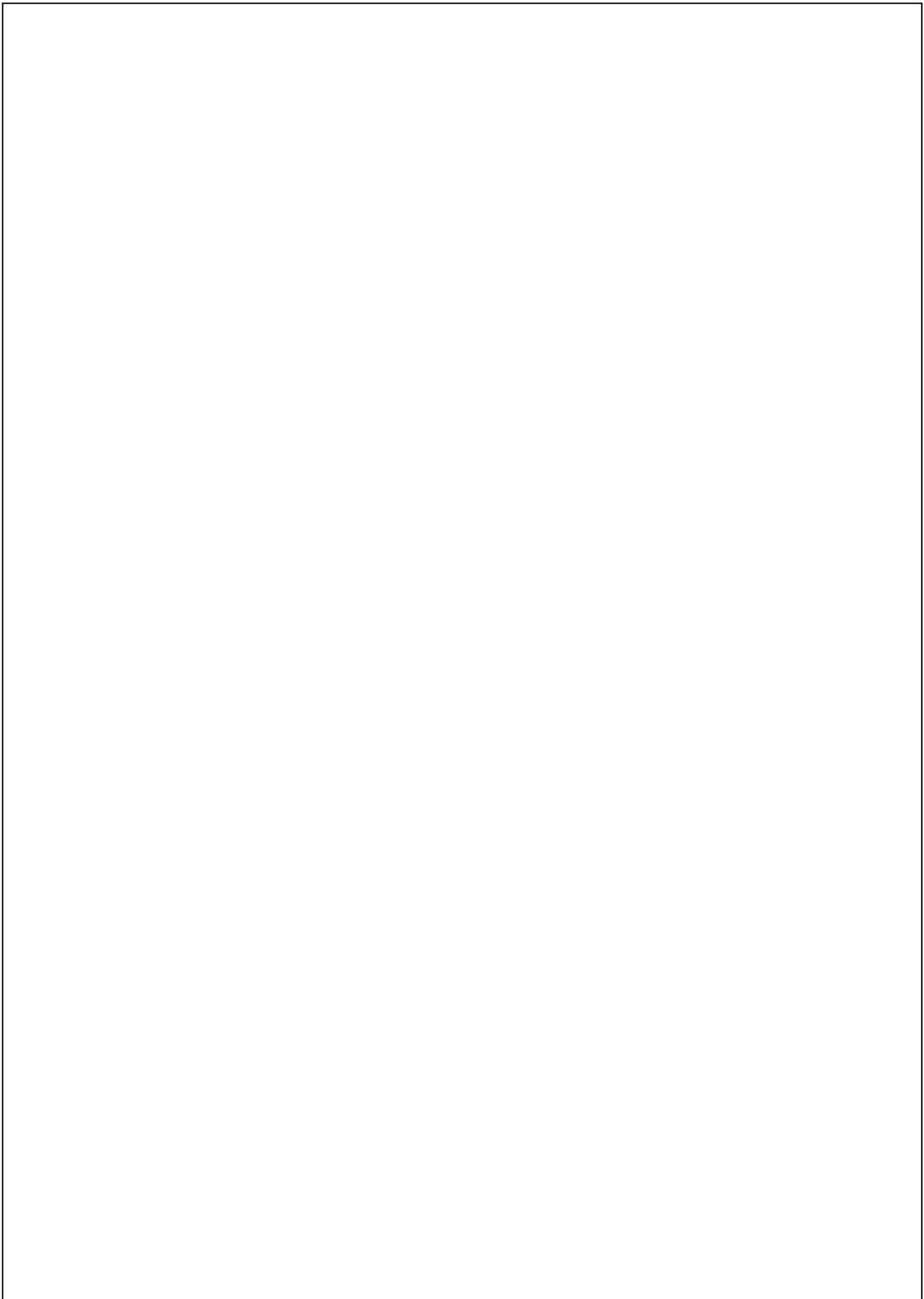
5. Kesimpulan

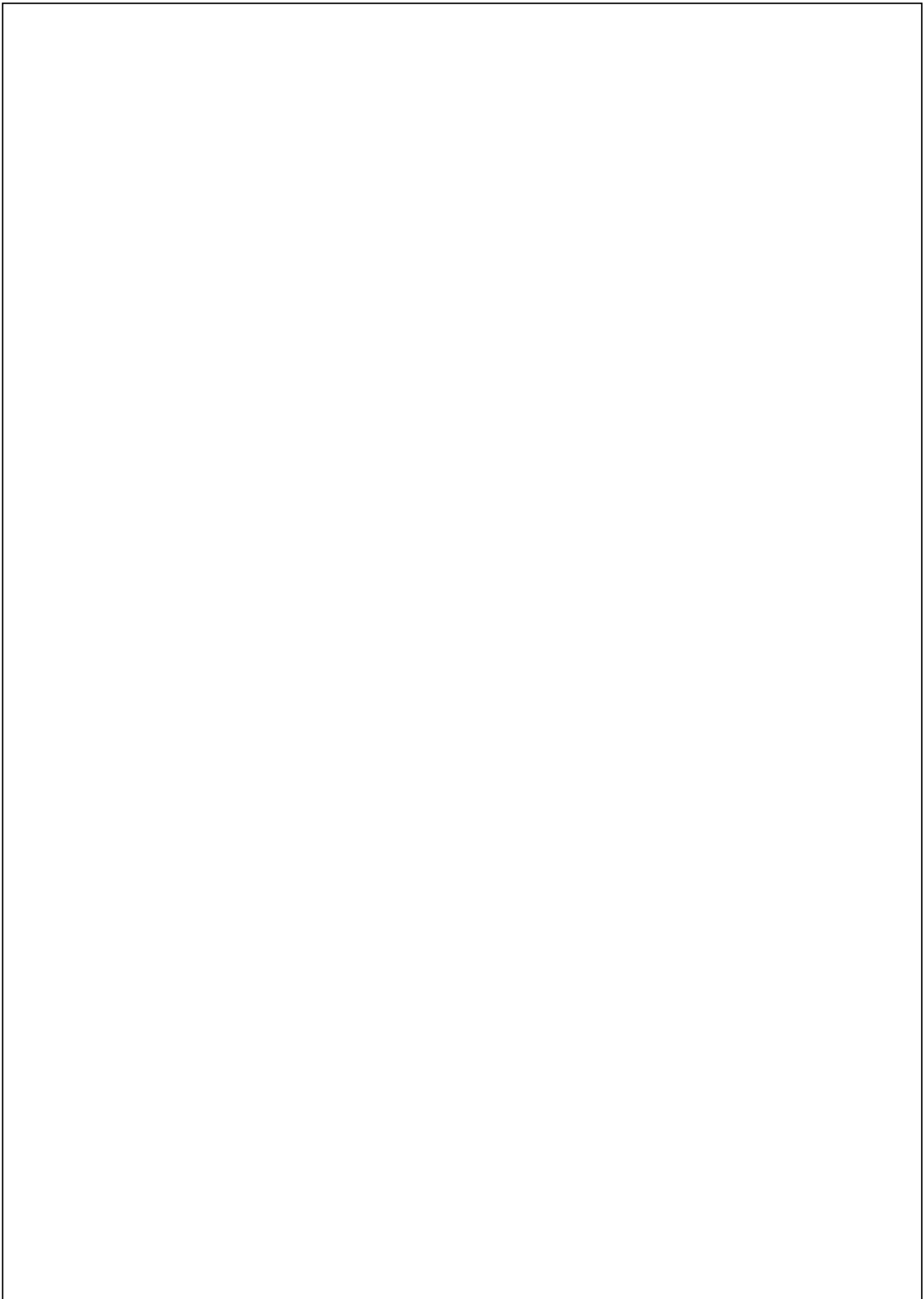
Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Ekstrak ubi kayu mempunyai efek sitotoksik ditunjukkan dengan kemampuan ekstrak ubi kayu dapat membunuh 50% sel HeLa (IC_{50}) pada konsentrasi 2553,296 ug/mL.
- Gambaran mikroskopis pad konsentrasi ekstrak ubi kayu 3000 ug/mL menunjukkan Sebagian (lebih kurang 50%) sel HeLa ada yang mati.
- Ekstrak ubi kayu hanya sebagai prolifervative karena nilai IC_{50} berbeda jauh dengan kontrol positifnya (doxorubisin).

Daftar Pustaka

1. Wahjana,J., 2007, Kanke Payudara Perempuan Usia Muda, Penelitian Pionir di Indonesia, RNW., Nederland
2. King, 2000, Sifat-sifat Sel Kanker hilangnya Kontrol Pertumbuhan, dalam 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap Sel HeLa, UMS, Surakarta
3. Anonima, 2007, Piperin digunakan Masyarakat sebagai Insektisida secara Tradisional.
4. Riono, 1999, Kanker Leher Rahim adalah Kanker yang Terjadi pada Serviks Uteri, dalam Padmi A., 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap Sel HeLa, UMS, Surakarta
5. Susanto,CE., 2007, Kematian akibat Penyakit Tak Menular Makin Tinggi, Info Actual Media Indonesia.com.id = 139295
6. Mangan, 2003, Mengobati Kanker dengan Obat Tradisional Lebih Murah, dalam PDMI, A., 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap Sel HeLa, UMS, Surakarta
7. Kinzios & Barberaki, 2003, Piperidin Merupakan Senyawa yang Memiliki Efek Anti Kanker, dalam Padmi,A., 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap Sel HeLa, UMS, Surakarta.
8. Sunila dan Kutan, 2003, LC50 ekstrak alcohol Piper longum sebesar 500 ug/mL untuk Sel DLA dan 250 ug/mL untuk sel EAC., dalam Padmi,A., 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap Sel HeLa, UMS, Surakarta
9. Nurhayati, 2007, Di Indonesia Setiap Satu Jam Seorang Wanita Meninggal Karena Kanker Srviks, Editor Supriadi, YLKI.
10. Cortes,M.L., Gracia-Escudo, V., Hughes,M.A., Izquierdo,M., 2002, Cyanide by Standar Effect of the Linamarin/linamarase Killer – Suicide Gene Therapy System., *J. Gene., Med.*, 4, 407 - 414
11. Cordis, 2006, New Treadment of Solid Tumours, Madrid
12. Kousparou,C.A., Epenetos, A.A., Deonarain,M.P., 2002, Antibody – guided enzyme Therapy of Cancer Producing Cyanide result in necrosis of Targeted Cells *Int. J. Cancer*, 99, 138-148
13. Fessenden, R.J. & Fessenden,J.S., 1989, Kimia Organik, ed. 3, terjemahan dari Organic Chemistry, Belmon, California
14. Ira, D. & Wahyudi, P., Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol EKstrak Daun *Annona squamosa*, P3 Teknologi Bioindustri BPPT, Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, April 2009, hal 7 – 11
15. Ika, P.N., 2011, Sitotoksitas Spora Laut *Aptos suberitoides* Terhadap Siklus Sel Kanker HeLa, Tugas Akhir, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya
16. Martini, Dwi Sutningsih dan Retno Hestningsih, 2005, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol *Momordica charantia* L., *Phylantus niruri* L., dan *Andrograhis pani-Culata* Ness Terhadap Sel HeLa, Mieloma dan Sel B 958 secara in vitro.





Linamarase

ORIGINALITY REPORT

13%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	123dok.com Internet Source	6%
2	rinarxiv.lipi.go.id Internet Source	3%
3	dokterkanker.wordpress.com Internet Source	2%
4	forum.tabloidnova.com Internet Source	1%
5	tedysuck.blogspot.com Internet Source	1%
6	core.ac.uk Internet Source	1%

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%