

## **Eksresi Cox-2 Sel Kanker Kolon WiDr Oleh Fraksi n-Heksana Bunga Pepaya Jantan (*Carica papaya L.*)**

**Yusnita**

Prodi Keperawatan Stikes Jabal Ghafur, Sigli, Aceh, Indonesia

Email : [yusnitacemerlang@gmail.com](mailto:yusnitacemerlang@gmail.com)

Tanggal penerimaan : 15 Oktober 2021

### **ABSTRAK**

Kanker kolon merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di seluruh dunia. Terdapat lebih dari 1,2 juta kasus tiap tahunnya menempatkan jenis kanker kolon sebagai urutan ketiga yang sering terjadi di dunia maupun di Indonesia. Sehingga dikembangkanlah produk bahan alam yang lebih aman. Namun berkhasiat Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai alternatif agent antikanker adalah bunga pepaya jantan (*Carica papaya L.*). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antikanker fraksi n-heksana bunga pepaya jantan terhadap penekanan ekspresi COX-2 pada sel WiDr secara *in Vitro*. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara perkolasi dengan pelarut etanol kemudian di fraksinasi dengan pelarut n-heksana. Fraksi n-heksana bunga pepaya jantan (FnHBPJ) diuji sitotoksiknya terhadap sel WiDr dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 Difeniltetrazolium Bromida), uji penekanan ekspresi COX-2 secara imunositokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> FnHBPJ pada sel kanker kolon WiDr sebesar 64,105 µg/mL. sehingga mampu menekan ekspresi COX-2

**Kata kunci** Bunga Pepaya jantan, WiDr, COX-2, Fraksi n-heksan, imunositokimia,

### **ABSTRACT**

Colon cancer is one of the leading causes of death worldwide. There are more than 1.2 million cases each year, making it the third most frequent type of colon cancer. Colon cancer is predicted to increase as the world population increases. Cancer treatment can be done in various ways such as surgery, radiation, chemotherapy but radiotherapy and chemotherapy in cancer is relatively limited due to high toxicity and side effects that are destructive and the emergence of resistance. So developed the products of natural materials more secure but same efficacy. One of the natural ingredients that can be used as an alternative anticancer agent is the papaya flower (*Carica papaya L.*). The aim of this research is to know COX-2 expression suppression the effect of n-hexane fraction of papaya flower *in vitro*. Preparation of the extract was done by percolation using ethanol solvent of papaya flower in fractionation with n-hexane. The n-hexane fraction of male papaya flower was cytotoxic tested against WiDr cells using MTT method (3- (4,5-Dimethylthiazole-2-yl) -2.5 Difeniltetrazolium Bromide), and suppression of COX-2 expression by immunocytochemical methods. The test Result of cytotoxic test of FnHBPJ on colon cancer cell WiDr gave IC<sub>50</sub> value equal to 62,76µg/mL.FnHBPJ can suppress COX-2 expression in colon cancer.

**Keywords:** Male papaya flowers, WiDr, cytotoxic, combination index, flowcytometry, immunocytochemistry

### **PENDAHULUAN**

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Terdapat lebih dari 1, 2 juta kasus kanker kolon baru pada tahun 2012, menempatkan kanker ini pada urutan ketiga jenis kanker dengan angka kematian tertinggi di dunia. Berdasarkan estimasi Globocan, International Agency for Research on Cancer (IARC) tahun 2012, diprediksi terdapat 14,1 juta kasus kanker baru dan 8,2 juta kematian akibat kanker pada tahun 2012, dimana kanker kolon dan rektum

menempati urutan ketiga dengan jumlah kasus sebesar 1,4 juta (9,7%). Angka penderita kanker kolon ini diprediksi akan terus meningkat seiring dengan penambahan penduduk baik di negara berkembang maupun negara maju (Siegel, et al., 2014).

Di Eropa, pada tahun 2004 terdapat 2.886.800 insidensi dan 1.711.000 kematian yang disebabkan oleh kanker. Boyle dan Ferlay dalam *Jurnal Cancer Incidence and Mortality in Europe 2004* menyatakan bahwa kanker yang terdiagnosa sebanyak 90% penderita mengalami kematian. Penderita kanker yang paling banyak

adalah kanker paru-paru (13,3%), diikuti oleh kanker kolon (13,2%) dan kanker payudara (13%). Kanker paru-paru merupakan penyebab kematian terbesar di Eropa sebanyak (341.800 kematian), kemudian diikuti oleh kanker kolon sebanyak 203.700 dan payudara sebanyak 129.900 (Boyle and Ferlay, 2005). Di Indonesia, kanker kolon menempati urutan keempat kematian akibat kanker setelah kanker paru, hati, dan payudara setiap tahunnya (Kemenkes, 2015).

Faktor yang memiliki pengaruh dalam perkembangan kanker kolon yaitu interaksi dari faktor lingkungan serta faktor genetik. Kanker kolon terjadi karena abnormalitas sel yang diakibatkan oleh mutasi DNA. Sel yang termutasi akan membentuk kolon dan berproliferasi secara tidak normal. Jaringan abnormalitas sel pada kanker kolon terlihat dari beberapa ekspresi protein contohnya *nitrotyrosine* dan *Nitric Oxide Synthases* (iNOS) yang menunjukkan bahwa terdapat inflamasi pada perkembangan sel kanker kolon. Salah satu pengobatan yang dilakukan pasien kanker kolon adalah kemoterapi (Morikawa, et al., 2005).

Naghshvar et al., (2009) melaporkan bahwa lebih dari 80% kasus kanker kolon menunjukkan adanya peningkatan ekspresi COX-2 dibandingkan dengan sel normal. Ekspresi COX-2 disebabkan oleh faktor-faktor pertumbuhan seperti Epidermal Growth Factor (EGF) atau faktor  $\alpha$  pertumbuhan tumor dalam sistem sel yang dapat menginduksi immunosupresi lokal.

Peningkatan prostaglandin E2 dan proliferasi inhibitor poten limfosit T, menyebabkan sel-sel kanker kolon dapat terhindar dari sistem pertahanan tubuh (tidak menjalani apoptosis), menunjukkan perubahan adhesi, dan sifat-sifat angiogenik (Gonzales-Angulo, Fuloria, and Prakash, 2002).

Pembentukan dan progresi kanker kolon dipengaruhi oleh enzim siklooksigenase-2 (COX-2), suatu enzim yang mengatur sintesis prostaglandin di ekspresikan secara berlebih di daerah inflamasi dan pada beberapa jaringan kanker (Sinicrope and Gill, 2004). Siklooksigenase-2 (COX-2) bertanggung jawab terhadap perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin E2. Prostaglandin E2 dapat

menghambat apoptosis pada sel kanker kolon WiDr. (Palozza, et al, 2005).

Agen kemoterapi kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah doksorubisin Berdasarkan penelitian (Meiyanto, et al., 2008), Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ko-kemoterapi ekstrak bunga pepaya jantan fraksi *n*-heksana dengan doksorubisin berdasarkan efek sitotoksiknya pada sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar penggunaan fraksi *n*-heksan bunga pepaya jantan secara kombinasi dengan doksorubisin sebagai agen kokemoterapi untuk mengobati kanker kolon yang lebih efektif dan efisien.

Pada penelitian ini menggunakan Sel WiDr karena memiliki kelebihan yaitu mudah dikulturkan dan memiliki doubling time yang singkat bila dibandingkan dengan kultur sel kanker kolon lainnya. Sel WiDr juga memiliki plating efficiency dan mengekspresikan COX-2 dengan jumlah yang tinggi (Palozza, et al., 2005).

Metode perkolasi dengan menggunakan ekstrak etanol bunga pepaya jantan difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) sehingga diperoleh nilai IC<sub>50</sub> setelah diberi perlakuan dengan fraksi *n*-heksana bunga pepaya jantan dengan berbagai seri konsentrasi. Penelusuran molekuler aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana bunga pepaya jantan juga perlu dilakukan melalui penekanan ekspresi COX-2 menggunakan metode immunositokimia. Sel WiDr yang digunakan pada penelitian ini merupakan model sel kanker kolon yang mengekspresikan COX-2 secara berlebihan, sehingga dapat dijadikan sebagai target molekuler dalam penemuan agen kemopreventif.

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini Bunga pepaya jantan (*Carica Papaya L*) dan bahan kimia yang digunakan kecuali dinyatakan lain adalah berkualitas pro

analisis, yaitu; 3,3'-diaminobenzidin (Sigma), air suling, annexin V, dimetilsulfoxida (DMSO) (Sigma), entellan, etanol, etilasetat, Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco), formaldehid 3,7%, Fungizone (amfoterisin B) 0,5 % (Gibco), hepes (Sigma), dan media Rosswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco); Tripsin-EDTA 0,25%; reagen MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida] (Bio Basic Canada Inc), M199, natrium bikarbonat (Macalalai tesque), Natrium dodesil sulfat dalam 0,01 N HCl, *n*-heksana, PBS (Gibco), antibodi primer COX-2 rabbit monoclonal (Lab Vision Corp.), antibodi sekunder Trekkie Universal Link (Anti Mouse and Rabbit-*biotinylated*), larutan DBA, reagen streptavidin (Trek Avidin-HRP label), metanol, larutan hidrogen peroksidase (blocking solution), aquades, larutan Maye Haemotoxilin, alkohol, xylol, dan Tripsin 0,5% (Gibco), Sel vero dan sel Widr merupakan koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

### Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, aluminium foli, *autoclave* (Hirayama), blender (Philips), cawan porselen alas rata, *conical tube*, deksikator, *elisa reader* (BenMark Biorad), hemositometer, *hand counter*, inkubator CO<sub>2</sub> (Heraceus), *inverted microscope* (Olympus), krus porselin bertutup, *laminar air flow* (Labconco), mikroskop fluoresensi (Zeiss Axioskop 40), mikropipet, neraca kasar (Home Line), neraca listrik (Vibra AJ), oven (Memmert), penangas air (Yenaco), *rotary evaporator* (Haake D1), *sentrifugator*, seperangkat alat penetapan kadar air, seperangkat alat destilasi, *vortex*, dan 96-well *plate*.

### Ekstraksi dan Fraksinasi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara perkolasi. Prosedur pembuatan ekstrak sebanyak 400 gr serbuk simplisia dibasahi dengan etanol 80% sebanyak 1 L dan dibiarkan selama 3 jam. Kemudian dimasukkan dalam perkolator. Lalu dituang cairan penyari etanol sampai semua simplisia terendam, mulut tabung

perkolator ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dan biarkan cairan menetes dengan kecepatan 1 ml per menit, perkolat ditampung, ditambahkan berulang-ulang cairan penyari secukupnya hingga selalu terdapat selapis cairan penyari diatas simplisia. Perkolasi dihentikan hingga perkolat berwarna bening, perkolat yang diperoleh diuapkan dengan alat penguap rotary evaporator pada tekanan rendah dengan suhu tidak lebih dari 40<sup>0</sup> C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak pekat etanol Bunga pepya Jantan ditimbang kemudian difarksinasi dengan pelarut *n*- heksan dan etilasetat, mula-mula difraksinasi dengan *n*- heksan sebanyak 200 ml, dilakukan tiga kali, kemudian di pekatkan dan ditimbang. residu difraksinasi lagi dengan etilasetat sebanyak 200 ml kemudiang ditimbang.

### Pengamatan ekspresi protein COX-2 dengan metode imunositokimia

Sel dengan jumlah  $5 \times 10^4$  sumuran didistribusikan ke dalam plat 24-well *plate* yang telah dilapisi dengan *coverslip* pada bagian dasarnya, kemudian diinkubasi untuk pengadaptasian sel selama 24 jam. Sel diberi perlakuan dan di inkubasi selama 8 dan 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan metanol dingin, dilanjutkan inkubasi dalam *freezer* -4°C selama 10 menit. Setelah itu, metanol dibuang dan *coverslip* yang memuat sel diletakkan pada *dish* bersih yang dialasi dengan tisu basah untuk menjaga kondisi tetap lembab. Sel yang telah difiksasi dengan metanol kemudian dicuci dengan akuades 3 kali dan diinkubasi dengan larutan *hidrogen peroksida blocking* selama 10 menit pada temperatur kamar kemudian dibuang. Sel tersebut kemudian diinkubasi dengan *prediluted blocking serum* selama 10 menit. Kemudian ditambahkan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (COX-2) ditambahkan pada sel kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. *Coverslip* kemudian dicuci dengan PBS dan ditetesi antibodi sekunder (*biotinylated universal secondary antibody*) dan kemudian diinkubasi selama 10 menit. Sel dicuci kembali menggunakan PBS dan ditetesi dengan

*streptavidin enzim horse radish peroxidase* dan diinkubasi selama 10 menit. Sel dicuci PBS kembali dan kemudian ditetesi dengan larutan DAB serta di inkubasi 10 menit, kemudian sel dicuci dengan akuades. Sel ditetesi dengan larutan *MayeHaematoxylin*, dan diinkubasi selama 3 menit, selanjutnya sel dicuci kembali menggunakan akuades sampai bersih, *Coverslip* diangkat dan dicelupkan kedalam xylol, kemudian dicelupkan alcohol. Setelah kering, *coverslip* diletakkan diatas kaca obyek dan ditetesi lem (*mounting media*) serta ditutup dengan *cover glass*. Kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya (CCRC, 2012)

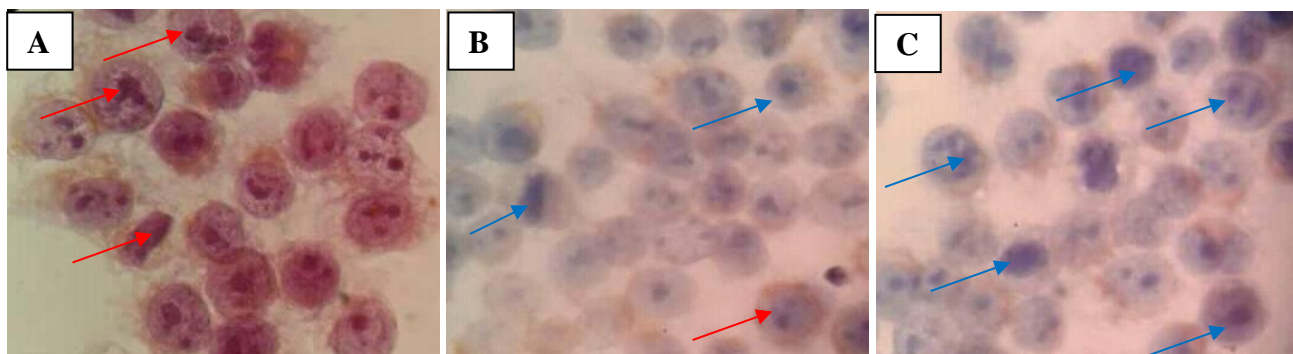
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji imunositokimia merupakan uji yang dilakukan untuk mendeteksi keberadaan suatu protein didalam sel. Tujuan dilakukan uji imunositokimia dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui seberapa besar kemampuan ekstrak dalam menghambat ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2), suatu protein yang banyak diekspresikan oleh sel kanker WiDr (Palozza, et al., 2004).

Pada penelitian ini, antibodi primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal primer

COX-2. Antibodi ini berikatan dengan reseptor COX-2 yang ada di sel kanker kolon WiDr dan memberikan warna coklat gelap ketika diberi pewarna DAB dari reagen imunositokimia. Ekspresi COX-2 hanya dianalisis secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya karena jumlah sel yang dapat dihitung tidak memadai untuk dianalisis secara kuantitatif. diduga ketika diberi perlakuan banyak sel yang mati sehingga sel tidak melekat pada kaca objek saat dipreparasi.

Pengamatan ekspresi COX-2 secara kualitatif, dapat dilihat dari warna yang dihasilkan pada sel WiDr. Pewarnaan secara enzimatis oleh peroksidase menyebabkan adanya warna yang berbeda antara sel yang mengekspresikan COX-2 dan sel yang tidak mengekspresikan COX-2. Sel yang mengekspresikan COX-2 akan berwarna kecokelatan yang pekat atau gelap (ditandai dengan tanda panah warna biru cerah) sedangkan sel yang tidak mengekspresikan COX-2 akan berwarna keunguan. Penghambatan ekspresi protein COX-2 dapat dilihat pada tabel ditunjukkan pada Tabel 4.4 dan gambar ekspresi COX-2 ditunjukkan pada



**Gambar** Hasil pengamatan ekspresi COX-2 pada sel kanker WiDr. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40. (A) kontrol (B) FmHBPJ (C) FmHBPJ dengan doksorobusin Ekspresi positif Ekspresi negatif

**Tabel 4.4** Hasil pengujian penghambatan ekspresi protein COX-2

Jenis perlakuan	Kadar	Warna	Hasil
Kontrol	-	Coklat	Semua sel
FNHBPJ	$\frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	Ungu/ Biru	Sebagian Sel
FNHBPJ-doxorobusin	$\frac{1}{4}$ IC <sub>50</sub>	Biru	Hampir semua Sel

Berdasarkan analisis secara kualitatif dapat terlihat bahwa kontrol (A) yang tanpa diberikan antibodi COX-2 memberikan warna coklat. Ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan sel bahwa yang mengekspresikan protein tertentu akan berwarna coklat/gelap, sedangkan yang tidak akan berwarna ungu/biru (Meiyanto, dkk., 2006). Penekanan ekspresi COX-2 akan menurunkan produksi prostaglandin PGE sehingga menghambat ekspresi COX-2, COX-2. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya steroid dan triterpen (aglikon). Membran sel yang tersusun dari lapisan fosfolipid merupakan prekursor dari COX-2 dan prostaglandin. Berdasarkan pengamatan menggunakan doksorubisin sebagai kontrol positif, menunjukkan doksorubisin lebih kuat menekan ekspresi COX-2 disebabkan jumlah sel yang berwarna ungu lebih banyak dibandingkan pada pemberian FnHBPJ. Pemberian doksorubisin dengan konsentrasi IC<sub>50</sub> sel kanker hampir mengalami lisis, ini kemungkinan disebabkan konsentrasi IC<sub>50</sub> doksorubisin sangat toksik pada sel WiDr namun masih dapat diamati efek penekanannya terhadap ekspresi COX-2 karena hampir seluruh sel memberi hasil negatif terhadap ekspresi COX-2.

Seperti halnya dengan pemberian FENBPJ jumlah sel yang mengekspresikan enzim COX-2 meningkat saat konsentrasi doksorubisin diturunkan menjadi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> artinya efek penekanan Peningkatan ekspresi COX-2 pada kanker kolon dapat dijadikan sebagai molekul target dalam menskrining senyawa sitotoksik. Senyawa sitotoksik apa yang terkandung dalam fraksi bunga pepaya jantan yang bertanggung jawab terhadap penekanan ekspresi COX-2 belum diteliti lebih lanjut, namun diduga senyawa terpenoid yang terkandung dalam FnHBPJ dapat menekan

ekspresi protein COX-2. Peningkatan ekspresi COX-2 yang berlebih pada sel kanker kolon diketahui dapat meningkatkan proliferasi sel dan memacu proses angiogenesis.

### KESIMPULAN

FnHBPJ dapat menekan ekspresi protein COX-2 terhadap sel kanker kolon WiDr

### DAFTAR PUSTAKA

- Boyle P., and Ferlay J.(2005).Cancer Incidence and Mortality in Europe. (2004). Oxford Journals Medicine *Annals of Oncology*. Volume (16). 481-488.
- CCRC<sup>a</sup> (Cancer Chemoprevention Research Centre). (2009). *Protokol Kultur Sel*. Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Centre. Halaman 1-7.
- CCRC<sup>b</sup> (Cancer Chemoprevention Research Centre). (2012). *Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Centre. Halaman 1-7.
- CCRC<sup>c</sup> (Cancer Chemoprevention Research Centre). (2012). *Preparasi Sampel Untuk Siklus dengan Metode Flowcytometry*. Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Centre. Halaman 1-7
- CCRC<sup>d</sup> (Cancer Chemoprevention Research Centre). (2012). *Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Imunositokimia*. Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Centre. Halaman 1-7.
- CCRC<sup>e</sup> (Cancer Chemoprevention Research Centre). (2008). *Protokol In Vitro*.

- Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Centre. Halaman 1-23.
- Gonzales-Angulo, A.M., Fuloria, J., and Prakash, O., 2002, Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Colon Cancer, *The Ochsner Journal*, 4, 176.
- Handayani, R., Sugiyanto, dan Salamah, N., (2001). Uji Sitotoksitas Senyawa Aktif Komponen Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr Terhadap Beberapa Cell Line. *Majalah Farmasi Indonesia*. 12(3): 140-151.
- Ikawati, M., Wibowo, A.E., Navista, S.O.U., & Adelina, R. (2008). Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker, *International Seminar of Indonesia – Malaysia Update 2008*, Universitas Gadjah Mada dan Universiti Sains Malaysia
- Ikawati, Z., Nugroho, A. E., dan Werdhinindah, W., (2006), Efek ekstrak etanol daun *Erythrina fusca* Lour (cangkring) terhadap penekanan ekspresi enzim siklooksigenase-2 pada kultur sel raji, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17 (2): 85-90.
- Immanuel, H., (2015), Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Etil Asetat Daun Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme*) Terhadap Sel Kanker Kolon WiDr Melalui Penekanan Ekspresi Protei COX-2, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Stop Kanker, Infodatin, Pusat Data Da informasi Mei 2015 [diakses tanggal 25 Mei 2015]. Tersedia dari : <http://www.depkes.go.id/download.php> file...kanker.pdf
- Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S., dan Rahmi, F. (2008). Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Area catechu l*) Mampu menghambat Proliferasi dan memacu Apoptosis Sel MCF-7, *Majalah Farmasi Indonesia*. 19(1) :12-19
- Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Kataoka S, Muraoka O, and Yoshikawa M., (2005). Inhibitor of nitric oxide production from the rhizomes of alpinia galanga: structures of new 8-9' linked neolignans and sesqueneolignan. *Pharmaceutical society of Japan*
- Naghshvar, F., Torabizadeh, Z., Emadian, O., Enami, K., and Ghahremani, M., 2009, Correlation of Cyclooxygenase-2 Expression and Inflammatory Cells Infiltration in Colorectal Cancer, *Pak. J. Biol. Sci.*, 12(1), 98-100.
- Palozza, P., (2005),  $\beta$ -Carotene Downregulates the steady-state and heregulin- $\alpha$  Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *J. Nutr.*, 135:n129-136.
- Sianipar, M.P. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Fraksi N-Heksan Dan Fraksi Etilasetat Bunga Pepaya Jantan (*Carica papayaL.*) Dengan Metode Dpph. Skripsi. Medan. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muslim Nusantara Al – Washliyah.
- Siegel, R., DeSantis, C., and Jemal, A., (2014), Colon Cancer Statistics *Cancer Journal for Clinicians 2014*, 64(2): 104-117.