

Fraksi Petroleum Eter Tanaman Ceplukan (*Physalis angulata* L.) Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis pada Sel HeLa

Petroleum Ether Fraction of *Physalis angulata* L. inhibited proliferation and induced apoptosis on HeLa Cell

Maryati* dan EM Sutrisna

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jalan A. Yani, Tromol Pos 1, Pabelan Kartasura, Surakarta
E-mail: maryatiwidi@gmail.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Results from various studies showed that cancer is still the major cause of death in Indonesia as well as in the world. Therefore, research to develop new cancer drug is important. Ceplukan (*Physalis angulata* L.) is one of the potential plants that can be developed as cancer chemoprevention agent. The aim of this research were to examine the cytotoxic effect of *Physalis angulata* L plant, to study the effect on the proliferation of HeLa cells and the apoptotic effect of *Physalis angulata* L plant on HeLa cells. *Physalis angulata* L plant were extracted using ethanol 96%. The extracts were fractionated using petroleum ether, chloroform and ethyl acetate. The cytotoxic effects of sample and observation on the proliferation of HeLa cells were determined using MTT method. The effect of sample on apoptosis was observed by doublestaining method using ethidium bromide-acridyne orange. Protein markers for apoptosis were measured by immunocytochemistry. The result showed that petroleum ether fraction had cytotoxic effects on HeLa cells with IC₅₀ value of 120.198 ug/ml. Petroleum ether fraction had inhibitory effect on the proliferation of HeLa cells and induced apoptosis of the cells by increasing the expresion of p53 and Bax protein.

Key words: *Physalis angulata* L., HeLa cells, MTT, cytotoxic, apoptosis

Abstrak

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kanker masih menjadi penyebab utama kematian di Indonesia, demikian juga di dunia. Oleh karena itu, penelitian untuk mengembangkan obat baru sangat penting untuk dilakukan. Ceplukan (*Physalis angulata* L.) adalah salah satu tanaman yang potensial untuk dikembangkan sebagai cancer chemoprevention agent. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik tanaman ceplukan serta efek pada proliferasi dan apoptosis pada sel HeLa. Tanaman ceplukan diekstraksi dengan etanol 96%, selanjutnya ekstrak difraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Penentuan efek sitotoksik dan pengaruh terhadap proliferasi sel HeLa dilakukan dengan metode MTT. Pengaruh sampel terhadap apoptosis pada sel HeLa dilakukan dengan doublestaining menggunakan ethidium bromide-acridyne orange. Protein markers pada apoptosis diamati dengan immunocytochemistry. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter mempunyai efek sitotoksik pada sel HeLa dengan nilai IC₅₀ sebesar 120,198 µg/ml. Fraksi petroleum eter menghambat proliferasi sel HeLa dan memacu terjadinya apoptosis dengan meningkatkan ekspresi protein p53 dan Bax.

Kata kunci: *Physalis angulata* L., sel HeLa, MTT, sitotoksik, apoptosis

Diterima: 29 Oktober 2010, disetujui: 02 Februari 2011

Pendahuluan

Kanker masih merupakan penyebab utama kematian di Indonesia dan di dunia. Penelitian untuk menemukan obat kanker yang

lebih efektif perlu terus dikembangkan. Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan sumber bahan obat alam nabati yang telah dimanfaatkan secara turun-temurun oleh masyarakat, termasuk untuk mengobati kanker

(Anonim, 2003). Bahan alam telah digunakan bertahun-tahun untuk pengobatan dan pencegahan penyakit, salah satunya untuk pengobatan kanker (Chin *et al.*, 2006). Salah satu cara yang digunakan dalam penemuan obat adalah dengan pendekatan data *ethnomedical*, seleksi tanaman berdasarkan informasi sebelumnya (penggunaan tanaman) pada pengobatan tradisional. Pencarian agen antikanker dari tanaman telah dimulai sejak tahun 1950-an dengan ditemukannya alkaloid vinkristin dan podopilatoksin (Tsuda *et al.*, 2004).

Physallis angulata merupakan salah satu jenis dari suku Solanaceae yang terdistribusi luas di Indonesia. Tanaman ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Ekstrak dan komponen kimia dalam tanaman ini diketahui memiliki efek antitumor, sitotoksik, penghambatan jalur ubiquitin-proteasome, immunomodulator, antibakteri, antiinflamasi, serta antialergik. Kandungan kimia dari tanaman ini yang mempunyai aktivitas tersebut antara lain withasteroid, glikosida flavonoid dan alkaloids (Shwu-Woan LEE, 2008).

Penelitian-penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa ekstrak *P. angulata* memiliki aktivitas immunomodulator (Lin *et al.*, 1992), ekstrak etanol *P. angulata* juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* seperti HA22T (hepatoma), KB (nashopharinx), Colo 205 dan Calu (human lung ephitelial cancer) (Chiang *et al.*, 1992). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa glikosida flavonoid dari *P. angulata* mempunyai efek sitotoksik pada sel kanker (Ismail dan Alam, 2001). Ekstrak etanol tanaman *P. angulata* menginduksi G2/M arrest dan menginduksi apoptosis pada *human breast cancer* MAD-MD 231 dan MCF-7 *cell line* (Michigan Cancer Foundation-7) ((Hsieh *et al.*, 2006). Withangulatin A dan withangulatin I yang merupakan senyawa “withanolide” yang diisolasi dari tanaman *P. angulata* terbukti memiliki efek sitotoksik pada “colorectal carcinoma” (COLO 205) dan “gastric carcinoma” (AGS) dengan IC50 (Inhibition concentration 50) dari withangulatin A adalah 16,6 dan 1,8 μm , dan IC50 dari withangulatin I

berturut-turut adalah 53,6 dan 65,4 μm (Lee *et al.*, 2008).

Obat-obat kemoterapi yang digunakan saat ini seperti etoposide, vincristine, 5-fluourasil, doxorubisin terbukti mampu menginduksi apoptosis pada beberapa sel kanker (Abdolmohammed *et al.*, 2008). Berdasarkan hal tersebut agen-agen yang dapat menginduksi apoptosis atau memengaruhi *cell cycle* menarik untuk dipelajari. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi kekayaan bahan alam Indonesia melalui pengujian efek sitotoksik dan mekanisme molekuler dari tanaman *P. angulata* terhadap sel HeLa.

Metode Penelitian

Bahan

Sample Tanaman

Tanaman Ceplukan (*Physallis angulata* L.) berasal dari Gantiwarno, Klaten dan dideterminasi di Laboratorium Morfologi dan Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FKIP, Universitas Muhammadiyah Surakarta. Sel HeLa diperoleh dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

Penyarian, Uji Sitotoksik dan Pengamatan Penghambatan Proliferasi Sel

Etanol 96%, PE (petroleum eter), kloroform dan etil asetat (Kualitas pro analisis), RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), fungizone, larutan penicillin-streptomisin, DMSO (Dimetil sulfoksid) sebagai pelarut sampel, SDS 10% (Sigma) dalam HCL 0,01 N (Merk), MTT (Sigma).

Pengamatan Apoptosis dan Immunositokimia

100X *Stock Solution*: 50 mg etidium bromida dan 15 mg akridin oranye dilarutkan dalam 1 ml etanol 95%, ditambah akuades 49 ml. 1X *Working Solution*: 1 mL 100X *Stock Solution* diencerkan menjadi 1/100 dalam PBS (*phosphate buffer solution*).

Aseton (Merck), serum kambing normal, antibodi primer terhadap Bax: SC493, p53:

NCL-p53-DO7, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), avidin, biotin, antibodi IgG biotinilasi sekunder (Lab Vision), konjugat avidin terhadap peroksidase “*horse radish*” (Lab. Vision), kromogen 3,3-diaminobenzidin (DAB) (Novo Castra), akuades, dan hematoksilin (Dako).

Cara Kerja

Ekstraksi

Seluruh bagian tanaman *P. angulata* dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutup kain hitam. Simplisia tersebut kemudian diserbuk. Serbuk simplisia disokhletasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak cair dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, dilanjutkan dengan penangas air. Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan cara dipartisi cair-cair dengan petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Sampel yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat (DepKes, 1986). Selanjutnya, penelitian untuk mengetahui mekanisme molekuler antikanker dilakukan pada sampel yang poten.

Uji Sitotoksik

Suspensi sel dalam medium RPMI 1640 sebanyak 100 μl (kepadatan $2,0 \times 10^4$ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5%. Kemudian ditambahkan 100 μl sampel dalam medium pada tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh konsentrasi akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/ml}$). *Plate* diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah itu ditambahkan 15 μl MTT 0,5% dalam PBS, kemudian diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C . Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Selanjutnya, formazan dilarutkan dalam larutan SDS (sodium dodecyl sulfate) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C . Serapan dari formazan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dihitung dari data absorbansi. Persen sel hidup diubah ke nilai probit, menggunakan tabel angka probit, kemudian dibuat kurva hubungan

log konsentrasi versus probit dan dihitung IC_{50} nya (Dai *et al.*, 2004).

Pengamatan Penghambatan Proliferasi

Pengamatan penghambatan proliferasi sel HeLa juga dilakukan dengan metode MTT, tetapi digunakan sampel pada konsentrasi yang tidak mematikan (di bawah nilai IC_{50}), pengamatan dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72 (Dai *et al.*, 2004).

Pengamatan Apoptosis

Sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 sampai 50% konfluen. Setelah itu diinkubasi dengan fraksi petroleum eter selama 24 jam. Selanjutnya, media diambil dan dilakukan *doublestaining*. *Cover slip* yang memuat sel diangkat, diletakan di atas objek glass dan ditambahkan 10 μl 1X *Working Solution* etidium bromida-akridin oranye, didiamkan selama 5 menit. Segera diamati di bawah mikroskop fluoresens. Sel hidup berfluoresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati dan apoptosis berfluoresensi oranye (dengan etidium bromida) (Dai *et al.*, 2004).

Immunositokimia

Sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ditanam pada *plate* 24 sampai 80% konfluen. Setelah itu diinkubasi dengan fraksi petroleum eter 120 $\mu\text{g/ml}$ selama 24 jam. Sel yang telah diinkubasi dipanen dan dibuat apusan pada gelas obyek (*poly-l-lysine slide*), selanjutnya preparat difiksasi dengan aseton. Preparat diletakkan dalam *normal mouse serum* (1:50) selama 15 menit, kemudian dibuang (tanpa cuci), direndam dengan Primer Antibodi Monoklonal anti p53/Bax (pengenceran 1:50) selama 60 menit dan dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dalam biotin selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit, dilanjutkan dengan diinkubasi dalam *streptavidin-peroksidase* selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit, diinkubasi dalam DAB selama 3–8 menit dan dicuci dengan akuades, kemudian direndam dalam hematoksilin selama 3–4 menit untuk *counterstain* dan dicuci dengan akuades.

Ekspresi protein diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan protein tertentu memberikan warna ungu/biru (Dai *et al.*, 2004).

Analisis Data

Uji Sitotoksik

Data yang diperoleh pada uji sitotoksik dengan metode MTT ini berupa absorbansi. Data absorbansi ini digunakan untuk menghitung persentase penghambatan pertumbuhan sel HeLa. Perhitungan dilakukan dengan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs p} - \text{abs m}) / (\text{abs k} - \text{abs m}) \times 100\%$$

Keterangan:

abs p : absorbansi perlakuan

abs k : absorbansi kontrol sel

abs m : absorbansi medium

Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji korelasi menggunakan metode probit melalui tabel, kemudian dibuat persamaan garis regresi $Y = BX + A$, dengan Y adalah angka probit dan X adalah log konsentrasi. Nilai probit 5 (50% sel hidup) dimasukkan ke dalam persamaan sehingga diperoleh harga IC_{50} (Dai *et al.*, 2004).

Pengamatan Penghambatan Proliferasi Sel

Data yang didapat pada uji pengamatan penghambatan proliferasi sel adalah absorbansi. Absorbansi menunjukkan banyaknya sel hidup. Selanjutnya data diuji statistik dengan uji korelasi waktu pengamatan *versus* absorbansi untuk menentukan persamaan garis regresi dan dilakukan uji t untuk menentukan signifikansi dari masing-masing data absorbansi (Dai *et al.*, 2004).

Pengamatan Apoptosis

Sel yang mengalami apoptosis akan terlihat berwarna oranye dan sel akan pecah sehingga terbentuk badan-badan apoptosis (Dai *et al.*, 2004).

Immunositokimia

Data uji immunositokimia ditampilkan berupa % ekspresi protein tertentu. Ekspresi

protein dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengekspresi protein tertentu dari keseluruhan sel dan dinyatakan dalam satuan %. Sel yang dihitung minimal 200 sel. Ekspresi positif jika warna coklat atau gelap dominan pada sel (dibandingkan dengan kontrol negatif) (Dai *et al.*, 2004).

Hasil dan Pembahasan

Uji Sitotoksik dan Pengamatan Penghambatan Pertumbuhan Sel HeLa

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida]. Sel hidup dapat mereduksi MTT, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT. MTT diabsorpsi oleh sel hidup dan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang ada dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan berupa zat warna ungu yang tidak larut dalam air (Doyle dan Griffiths, 2000), formazan selanjutnya dilarutkan menggunakan SDS 10%. Formazan terlarut kemudian diukur serapannya dengan *Elisa Reader*. Serapan yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel hidup.

Penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan menggunakan analisis probit yang didasarkan pada grafik fungsi linier log konsentrasi *versus* nilai probit dari prosentase sel hidup akibat perlakuan dengan fraksi petroleum eter (Tabel 1). Tabel 1 menunjukkan bahwa dari keempat sampel yang diujikan fraksi petroleum eter *P. angulata* mempunyai efek sitotoksik paling poten, karena itu penelitian terhadap fraksi ini dilanjutkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap proliferasi sel, induksi apoptosis dan mekanismenya terhadap sel HeLa.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa Physalin B, D, F yang diisolasi dari tanaman *P. angulata* mempunyai aktivitas sitotoksik yang besar terhadap sel KB, A431, HCT-8, PC3 dan ZR751 dengan IC_{50} kurang dari 4 $\mu\text{g/ml}$ (Kuo *et al.*, 2006). Apabila dibandingkan dengan penelitian-penelitian lain yang menguji aktivitas beberapa senyawa murni hasil isolasi dari *P. angulata*, efek sitotoksik dari fraksi petroleum eter ini memang kurang poten, hal itu mungkin disebabkan oleh dalam fraksi ini masih

terkandung banyak senyawa lain dimana tidak semua senyawa mempunyai efek sitotoksik. Apabila senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas sitotoksik ini diisolasi kemungkinan akan menunjukkan efek sitotoksik yang lebih poten.

Uji penghambatan pertumbuhan sel HeLa dilakukan dengan mengamati efek fraksi petroleum eter tanaman *Physalis angulata*. L terhadap waktu penggandaan sel HeLa. Senyawa yang dapat menunda waktu penggandaan sel, diduga menghambat gen-gen atau protein yang meregulasi *cell cycle*. Konsentrasi senyawa uji yang digunakan adalah 2 konsentrasi di bawah nilai IC_{50} , agar sel tidak terlalu banyak yang mati pada pengamatan selama 72 jam akibat sifat sitotoksik senyawa uji. Pada uji ini digunakan konsentrasi fraksi petroleum eter 25 dan 50 $\mu\text{g/ml}$. Uji ini dilakukan dengan metode MTT. Pengamatan dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72 (Tabel 2, Tabel 3 dan Gambar 1). Data absorbansi menggambarkan banyaknya sel hidup.

Dari hasil statistik ada pengaruh waktu (jam 24, 48, 72) terhadap perubahan absorbansi (banyaknya sel hidup) dengan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$). Selain itu perlakuan konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ dan 50 $\mu\text{g/ml}$ juga berbeda bermakna dengan nilai signifikansi : 0,000 ($p < 0,05$). Data absorbansi yang diperoleh kemudian dibuat kurva hubungan antara waktu pengamatan (jam) dan absorbansi. Dari persamaan regresi linier yang diperoleh (dengan melihat nilai slope) dapat diketahui efek penghambatan dari sampel terhadap proliferasi sel HeLa. Hal itu terlihat dari nilai slope persamaan regresi linier pada dua konsentrasi fraksi petroleum eter yang diujikan, lebih kecil dibandingkan slope pada kontrol sel tanpa perlakuan. Efek penghambatan sampel terhadap proliferasi sel berbanding lurus dengan konsentrasinya (Gambar 1). Semakin besar konsentrasi sampel semakin besar pula efek penghambatan terhadap pertumbuhan sel HeLa. Efek penghambatan proliferasi sel dari fraksi petroleum eter tersebut bersifat *dependent dose*. Data di atas menunjukkan bahwa perlakuan dengan fraksi petroleum eter tidak menghentikan *cell cycle*, tetapi kemungkinan hanya menyebabkan *cell cycle arrest* sehingga akan menghambat proliferasi sel.

Penelitian lain juga telah banyak menemukan tanaman yang mempunyai kemampuan untuk menginduksi *cell cycle arrest* dan berperan penting pada pencegahan dan terapi kanker. Flavonoid seperti genistein, daidzein dan isoflavonoids pada kedelai terbukti mempunyai peran penting pada pencegahan kanker payudara (Wang *et al.*, 2002). Selain itu kuersetin yang banyak ditemukan pada diet manusia terbukti mencegah proliferasi sel HCT-116, HT-29 (*colon carcinoma*) dan MCF-7, melalui mekanisme *cell cycle arrest* pada fase G2/M. Apigenin yang banyak ditemukan pada seledri juga diketahui mempunyai efek antiproliferasi terhadap sel MCF-7 melalui *cell cycle arrest* pada fase G2/M (Yin *et al.*, 2001) dan juga terbukti menginduksi aktivitas caspase pada HL-60 cells (Wang *et al.*, 1999). Selain mekanisme di atas penghambatan pompa natrium membran sel dan pemisahan single strand DNA penghambatan tirosin kinase dan interaksi antara flavonoid dan lipid pada bilayer membran juga merupakan kemungkinan mekanisme antikanker dari flavonoid (Hendrich, 2006).

Pengecatan DNA dengan *Doublestaining*

Apoptosis adalah program bunuh diri sel untuk menghilangkan sel rusak atau sel yang tidak normal. Induksi apoptosis pada sel tumor sangat bermanfaat pada manajemen, terapi dan pencegahan kanker. Dalam penelitian ini pengecatan DNA dilakukan untuk melihat morfologi dari DNA sel akibat inkubasi bersama dengan fraksi petroleum eter selama 24 jam. Pengecatan DNA dilakukan dengan *doublestaining* menggunakan etidium bromida-akridin oranye untuk melihat fenomena apoptosis secara jelas. Etidium bromida-akridin oranye akan berinteraksi dengan DNA. Akridin oranye akan diserap dengan baik oleh sel hidup maupun sel mati, sedangkan etidium bromida hanya diserap oleh sel yang telah kehilangan permeabilitas membran. Akridin oranye mewarnai sel hidup sehingga tampak hijau dan etidium bromida menyebabkan fluoresensi oranye pada sel yang mati dan pada sel yang apoptosis.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *Physalis angulata*, L.

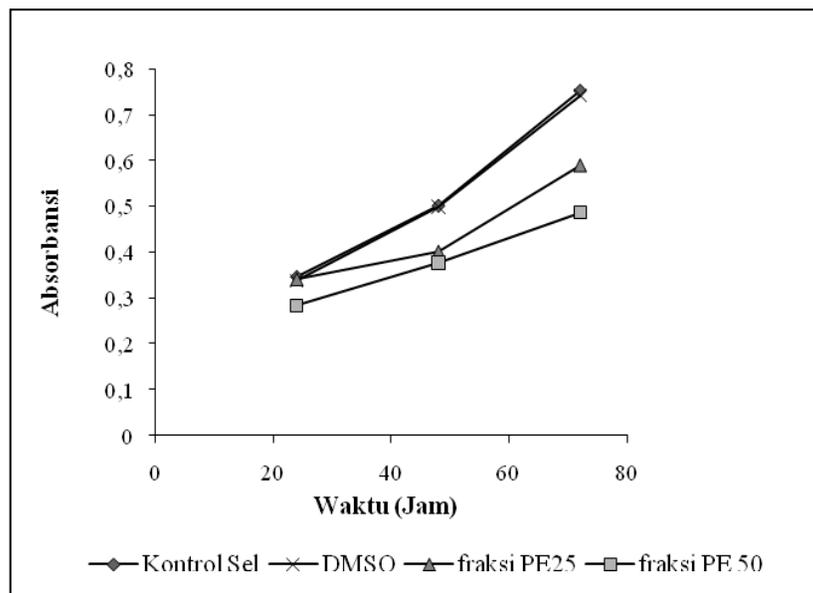
Sampel	IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak etanol	316,23
Fraksi petroleum eter	120,19
Fraksi kloroform	151,89
Fraksi etil asetat	461,64

Tabel 2. Hasil pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan fraksi petroleum eter *Physallis angulata* L.

Jam ke	Abs Kontrol media	Abs Kontrol sel	Abs DMSO	Abs Perlakuan (25 µg/ml)	Abs Perlakuan (50 µg/ml)
24	0,236	0,347	0,339	0,341	0,285
48	0,223	0,502	0,500	0,401	0,377
72	0,207	0,753	0,742	0,589	0,486

Tabel 3. Persamaan regresi linier pada pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan dengan fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Physallis angulata* L.

Perlakuan	Persamaan regresi linier	Slope
Kontrol sel	$Y = 0,0083x + 0,1420$	0,0083
DMSO	$Y = 0,0068x + 0,2153$	0,0068
Fraksi petroleum eter 25 µg/ml	$Y = 0,0052x + 0,1957$	0,0052
Fraksi petroleum eter 50 µg/ml	$Y = 0,0042x + 0,1817$	0,0042



Gambar 1. Profil pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan fraksi petroleum eter *P. angulata* L. Konsentrasi fraksi petroleum eter (PE) 25 µg/ml dan 50 µg/ml, pengamatan dilakukan pada jam ke-24, 48 dan 72.

Sel yang mengalami apoptosis mempunyai ciri-ciri membran sel *blebbing* tapi tidak kehilangan integritasnya, agregasi kromatin dan membran inti, sitoplasma menyusut dan terjadi kondensasi inti, dan fragmentasi sel menjadi badan-badan apoptosis (Wyllie *et al.*, 2000). Hasil *doublestaining* akibat pemberian fraksi petroleum eter konsentrasi 125 dan 150 µg/ml memperlihatkan adanya sel yang masih hidup dan sel yang kemungkinan mengalami apoptosis yang ditunjukkan oleh sel berwarna oranye. Perlakuan dengan fraksi petroleum eter konsentrasi 150 µg/ml memperlihatkan fenomena apoptosis yang lebih jelas (sel berwarna oranye dan terbentuk badan-badan apoptosis). Data tersebut menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter *P. angulata* mempunyai kemampuan memacu terjadinya apoptosis pada sel HeLa.

Gene p53 berperan penting terhadap karsinogenesis pada sel hewan maupun manusia dan merupakan regulator penting pada proses apoptosis. Mutasi pada p53 sebagai perubahan genetik yang biasa pada sel kanker manusia. Gen ini berperan sebagai *tumour suppressor gene*. Meskipun jalur apoptosis berhubungan dengan induksi p53, apoptosis dikendalikan oleh gen antiapoptosis bcl2. Protooncogen bax membentuk dimer dengan bcl-2 dan mempercepat proses apoptosis (Amit *et al.*, 2001).

Pengamatan Ekspresi p53 dan Bax Pada Sel HeLa Akibat Perlakuan dengan Fraksi Petroleum Eter

Protein p53 merupakan faktor transkripsi banyak gen yang antara lain mengatur proses

apoptosis, *cell cycle* dan angiogenesis. Adanya kerusakan DNA menyebabkan protein penekan tumor p53 meningkatkan ekspresi dari protein proapoptosis, seperti Bax, KILLER/DR5, NOXA atau Puma. Peningkatan ekspresi protein proapoptosis akan memacu pelepasan sitokrom C dari mitokondria dan mengkatalisis terjadinya apoptosis (Nakamura, 2004).

Ekspresi protein p53 dan Bax pada sel HeLa diamati dengan pengecatan immunositokimia menggunakan antibodi yang dilabel enzim *horseradish peroxidase*. Enzim ini akan bereaksi dengan kromogen DAB (diaminobenzidin) menjadi substrat berwarna coklat. Sel dengan ekspresi positif akan berwarna coklat/gelap oleh DAB, dan sel dengan ekspresi negatif berwarna ungu atau biru oleh *counterstain* hematoksilin. Ekspresi positif protein dibandingkan dengan kontrol negatif. Pada kontrol negatif dilakukan pengecatan tanpa antibodi primer sehingga warna yang ditimbulkan hanya ungu atau biru akibat *counterstain* hematoksilin.

Hasil pengamatan ekspresi protein p53 dan Bax pada sel HeLa dengan metode immunositokimia menunjukkan bahwa perlakuan dengan fraksi petroleum eter meningkatkan ekspresi p53 dan Bax (Tabel 4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter *P. angulata* mampu memacu terjadinya apoptosis pada sel HeLa. Hal ini terjadi diduga akibat peningkatan ekspresi p53 dan Bax. Protein p53 dan Bax merupakan protein proapoptosis. Peningkatan ekspresi protein ini akan memacu terjadinya apoptosis pada sel (Nakamura, 2004).

Tabel 4. Ekspresi p53 dan Bax pada sel HeLa pada kontrol dan perlakuan fraksi petroleum eter 120 µg/ml.

Perlakuan	Ekspresi p53 (%)	Ekspresi Bax (%)
Kontrol	20	61
Fraksi PE 150 µg/ml	48	87

Simpulan

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian ini dan interpretasi terhadap hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi petroleum eter tanaman *P. angulata*

memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan IC50 120,198 µg/ml. Fraksi petroleum eter tanaman *P. angulata* mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa. Fraksi petroleum eter tanaman *P. angulata* memacu terjadinya apoptosis pada sel HeLa melalui peningkatan ekspresi protein p53 dan Bax.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada DP2M Dikti yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Amit, K.T., Roy, M. dan Bhattacharya, R.K. 2001. Natural Products as Inducers of Apoptosis: Implication for Cancer Therapy and Prevention. *Current Science*, 80 (11): 1387–1396
- Anonim. 2003. Beberapa Tanaman yang Berkhasiat Sebagai Antikanker. *Info POM*, 4 (6): 1–3.
- Chiang, H.C., Jaw, S.M., Chen, C.F. dan Kan, W.S. 1992. Antitumor Agent from *Physalis Angulata* L. *Anticancer Res.*, 12 (3): 837.
- Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B. dan Kinghorn, A.D. 2006. Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS J.*, E239–253.
- Da'I, Meiyanto, M., Supardjan, E. dan Agustina, D. 2004. Efek Antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel Myeloma. *Sains kesehatan*, 17 (1): 1–6.
- DepKes. 1986. Sediaan Galenik, Jakarta.
- Doyle, A. dan Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medicinal Research*. John Willey and Sons Ltd, New York.
- Hendrich, A.B. 2006. Flavonoid-membrane Interactions: Possible Consequences for Biological Effects of Some Polyphenolic Compounds. *Acta Pharmacol Sin.*, 27 (1): 27–40.
- Hsieh, W.T., Huang, K.Y., Lin, H.Y. dan Chung, J.G. 2006. *Physalis Angulata* Induced G2/M Phase Arrest in Human Breast Cancer Cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 974–963
- Ismail, N. dan Alam, M. 2001. A Novel Cytotoxic Flavonoid Glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapi*, 72: 676–679.
- Kuo, P.C., Kuo, T.H., Damu, A.G., Su, C.R., Lee, E.J., Wu, T.S., Shu, R., Chen, C.M. dan Bastow, K.F. 2006. Physanolide A, a Novel Skeleton Steroid Other Cytotoxic Principles from *Physalis angulata*. *Org. Lett.*, 8: 2953–2956.
- Lee, S.W., Pan, M.H., Chen, C.M. dan Chen, Z.T. 2008. Wiyhangulin I, a new Cytotoxic Withanolide from *Ohysallis angulata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 56 (2): 234–6.
- Nakamura, Y. 2004. Isolation of p53-target Genes and Their Functional Analysis. *Cancer Sci.*, 95 (1): 7–11.
- Shwu-Woan, L.E.E., Min-Hsiung, P.A.N., Chiu-Ming, C.H.E.N. dan Zong-Tsi, C.H.E.N. 2008. Withangulatin I, a New Cytotoxic Withanolide from *Physalis angulata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 56 (2): 234–236.
- Tsuda, H., Ohshima, Y. dan Nomota, H. 2004. Cancer Prevention by Natural Compound. *Drug. Metab. Pharmacokin.*, 19 (4): 245–263.
- Wang, H.Z., Zhang, Y., Xie, L.P., Yu, X.Y. dan Zhang, R.Q. 2002 Effects of Genistein and Daidzein on The Cell Growth, Cell Cycle and Differentiation of Human and Murine Melanoma Cells. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 421–426.
- Wang, I., Lin-Shiau, S. dan Lin, J. 1999. Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Leukemia HL-60 Cells. *Eur. J. Cancer.*, 35: 1517–1525.
- Wyllie, A., Donahue, V., Fischer, B., Hill, D., Keeseey, J. dan Manzow, S. 2000. Cell Death Apoptosis and Necrosis. Rosche Diagnostic Corporation.
- Yin, F., Giuliano, A., Law, R. dan Van Herle, A. 2001. Apigenin Inhibits Growth and Induces G2/M arrest by Modulating Cyclin-CDK regulators and ERK Maps kinase Activation in Breast Carcinoma Cells. *Anticancer Res.*, 21: 413–420.