

**The Effect Of Ethanolic Extract Of Curcumin Roots (*Curcuma Xanthorrhiza*, Roxb)
Against *Caspase 3* Expression In Hela Cells**

**Pengaruh Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*, Roxb) Terhadap
Ekspresi *Caspase 3* Pada Sel Hela**

Bhimo Aji Hernowo¹, Indrayanti²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran UMY, ²Bagian Patologi Anatomi FK UMY,
hernowobhimo@gmail.com

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is a public health problem in Indonesia and in the world, due to the high incidence and mortality rate. Cervical cancer is the second most common type of cancer in women and accounts for more than 250,000 deaths in 2005. An understanding of carcinogenesis begins the development of promising new strategies for cancer prevention, namely the discovery of chemopreventive compounds. Chemopreventive is a compound that can be used to inhibit, delay, and restore the process of cancer. Temulawak contains curcumin and xanthorrhizol which are the main active substances in ginger which has activities as antioxidants, anticancer and immunomodulators that play an important role in inhibiting carcinogenesis.

Methods: A pure experimental study was carried out on cervical cancer hela cells by giving *temulawak* rhizome ethanol extract which was divided into 4 concentrations. Ethanol extract was carried out by cytotoxic test to determine IC50. Proapoptosis testing of cervical cancer hela cells by observing caspase 3 gene expression on immunocytochemical methods.

Results: Cytotoxic test performed obtained IC50 results of 32.36 $\mu\text{g} / \text{ml}$. IC50 values are then made into 3 concentrations, namely $\frac{1}{2}$ IC50, IC50, and 2xIC50. The results of ICC testing showed that there was an increase in caspase 3 gene expression index ($p > 0.05$) in the $\frac{1}{2}$ IC50 and IC50 concentration groups. Expression of caspase 3 in the IC50 concentration group was higher than that of the $\frac{1}{2}$ IC50 concentration group. In the 2xIC50 concentration group there are no live cells so that the expression caspase 3 cannot be seen.

Conclusion: The ethanol extract of ginger rhizome has the potential as a chemopreventive agent to prevent cervical cancer because it increases apoptotic activity in the cells of cervical cancer. The potential for cell apoptosis which is influenced by the temulawak (*curcuma xanthorrhiza*, roxb) ethanol extract with the optimal dose that can be used is IC50, which is 32.36 $\mu\text{g} / \text{ml}$. However, ethanol extract of temulawak rhizome did not significantly increase caspase3 expression after going through statistical tests.

INTISARI

Latar Belakang : Kanker serviks merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan di dunia, sehubungan dengan angka kejadian dan angka kematiannya yang tinggi. Kanker serviks merupakan jenis kanker terbanyak kedua pada wanita dan menjadi penyebab lebih dari 250.000 kematian pada tahun 2005. Pemahaman mengenai karsinogenesis mengawali upaya pengembangan strategi baru yang menjanjikan untuk pencegahan kanker yaitu penemuan senyawa kemopreventif. Kemopreventif merupakan suatu senyawa yang dapat digunakan untuk menghambat, menunda, dan mengembalikan proses terjadinya kanker. Temulawak memiliki kandungan kurkumin dan xanthorrhizol yang merupakan zat aktif utama pada temulawak yang memiliki aktifitas sebagai antioksidan, antikanker dan imunomodulator yang berperan penting pada penghambatan karsinogenesis.

Metode : Penelitian eksperimental murni dilakukan terhadap sel hela kanker serviks dengan pemberian ekstrak etanol rimpang temulawak yang dibagi menjadi 4 konsentrasi. Ekstrak etanol dilakukan uji sitotoksik untuk menentukan IC50. Pengujian proapoptosis sel hela kanker serviks dengan mengamati ekspresi gen caspase 3 pada metode immunositokimia.

Hasil : uji sitotoksik yang dilakukan mendapatkan hasil IC50 sebesar 32.36 µg / ml. Nilai IC50 kemudian dijadikan 3 konsentrasi yaitu, ½ IC50, IC50, dan 2xIC50. Hasil dari pengujian ICC menunjukkan bahwa terjadi peningkatan indeks ekspresi gen caspase 3 ($p > 0.05$) pada kelompok konsentrasi 1/2IC50 dan IC50. Ekspresi dari caspase 3 pada kelompok konsentrasi IC50 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok konsentrasi 1/2IC50. Pada kelompok konsentrasi 2xIC50 tidak terdapat sel hidup sehingga tidak dapat dilihat ekspresi caspase 3.

Kesimpulan : Ekstrak etanol rimpang temulawak berpotensi sebagai agen kemopreventif untuk mencegah kanker serviks karena meningkatkan aktivitas apoptosis pada sel HeLa kanker serviks. Potensi apoptosis sel yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol rimpang temulawak (curcuma xanthorrhiza, roxb) dengan dosis optimal yang dapat digunakan adalah IC50 yaitu 32.36 µg / ml µg / ml. Namun, ekstrak etanol rimpang temulawak tidak meningkatkan ekspresi caspase3 secara signifikan setelah melalui uji statistik.

Key word: curcuminoid, xanthorrhizol, apoptosis, anti karsinogenesis, Immunositokimia.

Pendahuluan

Kanker serviks atau umumnya disebut kanker mulut rahim merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan di dunia, sehubungan dengan angka kejadian dan angka kematiannya yang tinggi. Meskipun sudah ditemukan penatalaksanaan terapi pada penderita kanker serviks, namun kematian akibat kanker serviks masih tinggi yaitu sebesar 250.000/tahun. Diperlukan strategi baru dalam penanganan permasalahan kanker servik di Indonesia di samping sistem pengobatan yang sudah ada agar terjadi penurunan kejadian kanker serviks di masyarakat¹. Semakin mahalnya harga obat modern dan reaksi efek samping obat telah mendorong laju gerakan *back to nature*². Sebagai negara terbesar ke-2 dalam hal keragaman dan jumlah tanaman obat, Indonesia berpeluang besar untuk mengembangkan tanaman obat/jamu sebagai alternatif penanganan masalah kanker serviks di masyarakat.

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) adalah salah satu tanaman obat bahan jamu yang secara empiris sudah dimanfaatkan oleh masyarakat luas untuk peningkatan nafsu makan, antioksidan, antikanker, hepatoprotektor, dan peningkatan imunitas tubuh^{3,4}. Kurkumin dan xanthorrhizol merupakan zat aktif utama temulawak⁴. Secara laboratorik telah dibuktikan bahwa xanthorrhizol temulawak memiliki efek sebagai antiinflamasi, antikanker, antioksidan, antihiperlipidemia, antibakteri dan antihipertensi⁵. Sebagai antikanker, temulawak telah dibuktikan secara laboratorik in vitro memiliki aktifitas proapoptosis dan anti proliferasi pada beberapa jenis sel kanker. Cheah et al (2006) telah membuktikan bahwa xanthorrhizol bersifat sitotoksik terhadap sel kanker mammae MCF7 dengan menginduksi apoptosis. Handayani et al. (2007) dengan menggunakan sel kanker hepatoma

menunjukkan bahwa mekanisme proapoptosis dari senyawa xanthorrhizol adalah melalui pengaturan aktifitas gen caspase 3, Bax dan Bcl2. Gen caspase 3 merupakan gen proapoptosis yang bersifat antikarsinogenesis. Berdasarkan data hasil penelitian ini maka ekstrak rimpang temulawak diduga mencegah karsinogenesis kanker serviks melalui pengaturan gen caspase 3⁶.

Kanker serviks merupakan tumor ganas yang terjadi pada sel epitel squamosal. Karsinogenesis merupakan proses modifikasi genetik yang terjadi pada sel normal menjadi bentuk progresif bahkan dapat menjadi ganas. Perlu dilakukan tinjauan lebih lanjut untuk menemukan strategi baru dalam usaha preventif pada penyakit kanker sebagai terapi tambahan sebagai kemopreventif. Sebelum kanker, terjadi lesi prekanker atau disebut *cervical intraepithelial neoplasia (NIS)*. Penyebab utama terjadinya kanker adalah infeksi dari Human Papilloma Virus (HPV)⁷. Kanker serviks merupakan penyakit progresif, diawali dengan intraepitel, transformasi ke bentuk neoplastik, dan terjadinya kanker serviks setelah 10 tahun atau lebih. Pada gambaran histopatologi, lesi preinvasif biasanya berkembang menjadi displasia berat ke dalam in situ dan akhirnya akan terjadi karsinoma. Karsinogenesis pada umumnya proses dari perubahan kanker disebabkan karena mutasi dari cell cycle control gene. Berdasarkan karsinogenesis pada umumnya, proses perubahan sel kanker disebabkan oleh mutasi pada gen pengatur siklus sel. Gen pengatur yaitu onkogen, gen supresor tumor, dan gen perbaikan. Onkogen dan gen supresor tumor mempunyai efek yang berkebalikan dalam karsinogenesis, dimana onkogen akan memulai terjadinya transformasi keganasan, disaat gen supresor tumor akan menghambat perkembangan tumor dengan mempengaruhi pertumbuhan sel. Meskipun kanker invasif berkembang melalui perubahan intraepitel, tidak semua

perubahan ini berkembang menjadi invasif. Lesi preinvasif akan mengalami regresi spontan sebanyak 3 -35%. Kandungan temulawak diduga terlibat dan memainkan peran penting dalam perubahan tahap karsinogenesis pada kanker serviks.

Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram yang terjadi pada organisme multiseluler. Kejadian biokimia menyebabkan perubahan sel karakteristik (morfologi) dan kematian. Perubahan ini meliputi blebbing, penyusutan sel, fragmentasi nuklir, kondensasi kromatin, fragmentasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) kromosom, dan peluruhan *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) global. Antara 50 dan 70 miliar sel mati setiap hari karena apoptosis pada rata-rata manusia dewasa. Terdapat dua jalur apoptosis yaitu ekstrinsik dan intrinsik.

Masalah dan Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang ini, rumusan masalah penelitian ini secara umum adalah bagaimana mekanisme temulawak kemopreventif pada sel HeLa. Lebih khusus masalah penelitian adalah bagaimana pengaruh ekstrak temulawak pada ekspresi caspase 3 dan caspase-9 pada sel HeLa. Penelitian ini dirancang untuk menjawab tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak temulawak pada ekspresi caspase 3 dan caspase-9 pada sel HeLa.

Metode

1. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temulawak

Sampel dimasukkan dalam botol bertutup 25 ml; 10,0 ml etanol ditambahkan secara seksama. Sampel disimpan pada tempat gelap selama 24 jam; 1 ml bagian bening diambil dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse; sampel disentrifus selama 5 menit pada 10.000 rpm (sampel siap ditotolkan).

2. Pembuatan berbagai konsentrasi larutan uji

Sampel dari ekstrak etanol temulawak ditimbang sebanyak 10mg kemudian dilarutkan kedalam 100µl DMSO sehingga diperoleh konsentrasi larutan sampel adalah 100.000 µg/ml. selanjutnya dibuat seri konsentrasi sebesar 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, dan 15,5125 µg/ml. Konsentrasi ekstrak etanol temulawak yang diuji adalah empat konsentrasi terendah yaitu 125, 62,5, 31,25 dan 15,5125 µg/ml.

3. Biakan sel HeLa kanker serviks

Kultur sel HeLa diambil dari stok yang disimpan dalam tangki cair yang diletakkan dalam lokator pada suhu -196°C. Ampul yang berisi sel dicairkan dalam air ± 37.7 °C, kemudian ampul disemprot dengan alkohol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi 10 ml medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama ± 5 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml medium penumbuh RPMI 1640 yang mengandung FBS 10%. Lalu diresuspensikan perlahan sampai homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa (2-3) buah tissue culture flask kecil dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ dan 95% O₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian¹⁰.

4. Pemanenan sel HeLa

Setelah jumlah sel HeLa cukup atau konfluen (± 70%), medium dibuang. Selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Kemudian ditambahkan tripsin 0,25% sebanyak 300 µL, dan diinkubasi selama tiga menit di dalam inkubator. Selanjutnya ditambahkan ± 5 mL medium kultur, lalu diresuspensi secara perlahan menggunakan

pipet. Sel telah siap digunakan untuk penelitian¹¹.

5. ICC

Sel HeLa dengan populasi 2×10^5 ditanam dalam 6 *well*-plate yang telah diberi *cover slip*. Setelah inkubasi 24 jam dan sel telah konfluen, media kultur dibuang. Sel diberi perlakuan dengan menambahkan 1 mL sampel konsentrasi $\frac{1}{2}IC_{50}$ dan cisplatin konsentrasi IC_{50} , diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 . PBS ditambahkan ke *cover slip*, lalu dibuang. Penambahan PBS dilakukan sebanyak dua kali dan difiksasi menggunakan metanol 300 μ L yang bertujuan mempertahankan morfologi sel, diinkubasi selama 10 menit, lalu dibuang. *Cover slip* diambil dan dipindahkan ke kaca preparat, kemudian *cover slip* ditambahkan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) sebanyak 1 mL untuk menghambat peroksidase endogen, diinkubasi selama 10 menit, lalu dibuang. Cuci *cover slip* dengan akuades sebanyak 1 mL. PBS 1 mL ditambahkan pada *cover slip*, dan didiamkan selama 5 menit, lalu dibuang. *Cover slip* diberi larutan *blocking* 20 μ L selama 10 menit untuk mencegah ikatan tidak spesifik antibodi sekunder, lalu dibuang, diberi antibodi primer 50 μ L didiamkan selama 1 jam, setelah itu dibuang dan diberi PBS diulang sebanyak dua kali. Kemudian *cover slip* diberi antibodi sekunder 30 μ L untuk memperjelas pewarnaan dan diinkubasi selama 10 menit, lalu ditambahkan PBS inkubasi 2 menit, lalu dibuang, dan diulang 2 kali. *Cover slip* diberi larutan diaminobenzidin (DAB) sebagai pewarna coklat sebanyak 50 μ L diinkubasi selama 7 menit, dan ditambahkan akuades lalu dibuang. Larutan *MayerHaematoxylin* ditambahkan dan diinkubasi selama 3 menit untuk membedakan warna sel, lalu ditambahkan akuades dan dibuang. *Cover slip* diangkat dengan pinset dan digenangi etanol, lalu *cover slip* dikeringkan. *Cover slip* diletakkan di atas *object glass*, dan ditetesi dengan lem (*mounting media*), kemudian

ditutup dengan *cover slip* kotak. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya

Hasil dan Pembahasan

1. Uji Potensi kemopreventif ekstrak etanol rimpang temulawak pada sek kultur HeLa
Hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) terhadap ekspresi gen caspase3 pada sel hela kanker serviks menunjukkan adanya potensi temulawak sebagai agen *chemopreventive* pada sel kanker serviks. Uji potensi kemopreventif ekstrak etanol rimpang temulawak menggunakan metode MTT kultur sel kanker serviks HeLa. Reduksi dari garam terazolium dari jernih menjadi sedikit berwarna menjadi larutan dengan turunan warna terang keunguan yang disebut dengan formazan, digunakan sebagai dasar penggunaan metode ini sebagai pewarna yang digunakan pada redox histokimia dan biokimia (Berridge, 2005). Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak

Tabel 1. Hasil pengujian sitotoksitas ekstrak temulawak terhadap persen kehidupan sel HeLa

Konsentrasi	Nilai absorbansi perlakuan (AP)	AP-AKM (0,0795)	% Sel Hidup
50	0,354	0,2745	0,25
25	0,6946	0,6151	0,75
12,5	0,6636	0,5841	37,08
3,125	0,743	0,6635	98,58
Absorbansi Kontrol Media (AKM) 0,0795		Absorbansi Kontrol Pelarut (AKP) 0,6795	

larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup, jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak¹². Absorbansi yang didapatkan digunakan

untuk menghitung presentase sel hidup dengan rumus sebagai berikut; Presentase sel hidup = $\frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$

Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 1

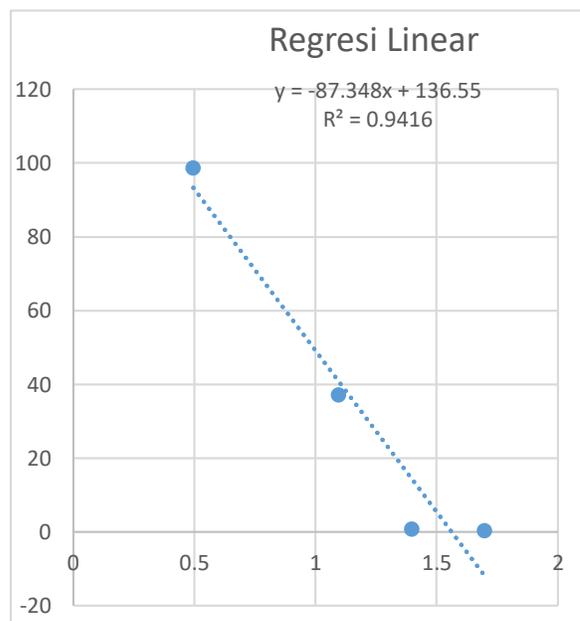
Berdasarkan data dari tabel dapat disimpulkan bahwa semakin rendah konsentrasi ekstrak temulawak maka presentasesel hidup semakin tinggi

2. Perhitungan Nilai IC50

IC50 adalah konsentrasi suatu zat (ekstrak etanol rimpang temulawak) penghambat yang bisa menghambat fungsi biologis atau biokimiawi, pada penelitian ini yaitu aktivitasproliferasi sel HeLa kanker serviks sebesar 50%. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan metode MTT yang dilakukan pada kelompok konsentrasi 200µg/ml didapatkan hasil yang memenuhi syarat untuk bisa didapatkan nilai IC50. Hasil

dan perhitungan nilai IC50 dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 1.

Gambar 1 Grafik Data pengukuran uji regresi linear



Tabel 2. Data pengukuran uji regresi linear

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Sel Hidup
50	1,69897	0,25
25	1,39794	0,75
12,25	1,09691	37,08
3,125	0,49485	98,58
Nilai Regresi Linier		$y = -87.348x + 136.55$ $R^2 = 0.9416$

Potensi kemopreventif pada uji MTT menunjukkan bahwa nilai IC50 dari ekstrak temulawak pada sel HeLa dapat diukur dari nilai $y=5$. Nilai IC50 dapat ditentukan melalui antilog dari nilai x pada persamaan regresi tersebut dimana $y=5$.

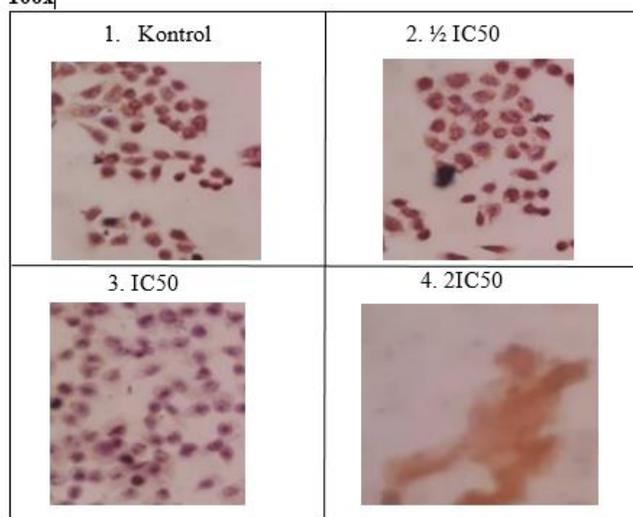
$$y = -87.348x + 136.555 = -87.348x + 136.55$$

$$x = \frac{5 - 136.55}{-87.348} = 1.506 \text{ -----} \rightarrow$$

$$\text{Antilog IC50} = \frac{32.36 \mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Menurut Kamuhabwa et al. (2000), jika suatu ekstrak memiliki nilai IC 50 <100 $\mu\text{g/ml}$ maka dapat dikatakan memiliki potensi sebagai antiproliferasi, sedangkan menurut National Cancer Institute (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong antikanker jika IC 50 <20 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza, Roxb*) berpotensi sebagai agen

kemopreventif pada kanker serviks.
Gambar 4.1 Ekspresi caspase 3 pada sel HeLa dengan perbesaran 100x



3. Tes ekspresi caspase 3 dari ekstrak temulawak pada kultur sel HeLa

Sel HeLa kemudian diberi perlakuan dengan tes uji imunositokimia dengan menggunakan reagen Caspase 3. Perbandingan gambaran sel HeLa control dan perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.1.

Setelah dilakukan pengujian potensi chemopreventive dari ekstrak temulawak terhadap kultur sel kanker serviks HeLa, kemudian dilakukan pengujian imunositokimia untuk mengetahui pengaruh ekstrak temulawak terhadap ekspresi dari caspase-3 pada kultur sel Hela. Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada tabel 3

Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak temulawak meningkatkan ekspresi caspase-3 pada kultur sel kanker serviks HeLa pada

Tabel 3. Ekspresi Caspase 3 dari hasil pengenceran ekstrak temulawak pada sel HeLa

Kelompok	Ekspresi +	Ekspresi -	Indeks ekspresi caspase-3 (ekspresi+/total sel)
1/2 IC50 (n=3)	138,33±33,36*	70,00±14,00*	0.66±0.01*
IC50 (n=3)	105,00±17,34*	32,00±8,80*	0.76±0.07*
2xIC50 (n=3)	n.a.	n.a.	N.A.
Media (n=3)	65,67±31,50	119,67±5,51	0.34±0.01

keterangan:*=P<0.05 terhadap kelompok media

kelompok konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC50 dan kelompok konsentrasi =IC50 yang dinuktikan dengan peningkatan index ekspresi caspase-3. Ekspresi caspase-3 pada kelompok konsentrasi = $\frac{1}{2}$ IC50 lebih tinggi dibandingkan pada kelompok konsentrasi = IC50. Pada kelompok konsentrasi =2IC50 tidak terdapat sel yang nampak sehingga tidak bisa dinilai ekspresi dari caspase-3. Berdasarkan tabel 2 diketahui bahwa ekstrak temulawak meningkatkan ekspresi caspase 3 pada sel HeLa kanker serviks pada kedua kelompok konsentrasi. Hasil dari perhitungan ekspresi gen caspase 3 pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC50 dan IC50 terjadi peningkatan index ekspresi caspase 3 ($p < 0.05$). Ekspresi dari caspase 3 pada kelompok konsentrasi =IC50 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC50. Pada kelompok konsentrasi 2xIC50 tidak terdapat sel yang hidup sehingga ekspresi caspase 3 tidak dapat dilihat. Hasil dari data tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi IC50 efektif untuk meningkatkan proses apoptosis pada sel HeLa kanker serviks.

Kandungan zat aktif dalam temulawak seperti Xanthorrhizol memiliki peranan penting dalam menginduksi apoptosis. Xanthorrhizol menginduksi aktivasi caspase. Caspase memainkan peran penting dalam fase terminal apoptosis yang disebabkan oleh rangsangan pengobatan xanthorrhizol yang menyebabkan peningkatan yang tergantung waktu dalam aktivitas caspase-3 dan -9 hal ini terbukti pada 24 jam dan secara bertahap meningkat lebih dari 72 jam. Aktivitas caspase-7 tidak terpengaruh oleh pengobatan xanthorrhizol.

Hasil ini menunjukkan bahwa caspase-3 dan -9 terlibat dalam jalur kematian yang diinduksi xanthorrhizol¹³. Apoptosis merupakan proses yang diregulasi secara ketat di bawah kendali beberapa jalur penyinyalan, seperti jalur mitokondria dan kaskade caspase¹⁴. Xanthorrhizol menginduksi aktivasi protein penekan tumor p53 yang menyebabkan protein anti-apoptosis Bcl-2 mengurangi waktu respon tanpa mempengaruhi ekspresi protein pro-apoptosis Bax. Secara khusus, protein anti-apoptosis Bcl-2 dan protein pro-apoptosis Bax telah dilaporkan dapat mengatur induksi apoptosis melalui kontrol fungsi mitokondria¹⁵. Kapasitas Bcl-2 dan Bax untuk bersaing satu sama lain melalui heterodimer menunjukkan hubungan timbal balik di mana Bcl-2 monomer atau homodimers mendukung kelangsungan hidup dan Bax homodimers mendukung kematian¹⁶. Aktivitas perforasi saluran ion Bcl-2 dan Bax dapat mengontrol apoptosis dengan mempengaruhi permeabilitas membran dan pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Ekspresi berlebih Bcl-2 memblokir pelepasan sitokrom c sebagai respon terhadap berbagai rangsangan apoptosis¹⁷. *Downregulation* Bcl-2 memiliki kontribusi melepas sitokrom c dari mitokondria. Selain itu, Bcl-2 yang berheterodimerisasi dengan Bax memberikan penghambatan negatif dominan aktivitas Bax pro-apoptosis¹⁸. Oleh karena itu, ketika tingkat ekspresi Bcl-2 rendah dan tingkat ekspresi Bax dipertahankan, homodimer dari Bax akan selalu tersedia dan apoptosis akan dirangsang¹⁹. Setelah dilepaskan dari mitokondria, sitokrom c berinteraksi dengan

Apaf-1 yang mendukung aktivasi procaspase-9. Caspase-9 dapat memodulasi aktivasi caspases eksekusi, caspase-3 dan caspase-7 oleh enzim proteolisis, sehingga mengirimkan sinyal apoptosis ke fase eksekusi²⁰. Caspase-7 sangat terkait dengan caspase-3 dan menunjukkan spesifitas substrat sintesis yang sama, hal ini menunjukkan bahwa caspase-3 dan -7 mungkin memiliki peran tumpang tindih dalam apoptosis²¹. Menurut data saat ini, xanthorrhizol menyebabkan aktivasi p53 dan pengurangan Bcl-2 yang kemudian mengaktifkan aktivitas molekuler mitokondria yang diinduksi termasuk aktivasi caspase-9 dan caspase

Induksi apoptosis oleh xanthorrhizol melibatkan aktivasi kaskade caspase diinduksi mitokondria dan penghambatan protein anti-apoptosis Bcl2. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang telah menunjukkan bahwa mitokondria dapat memainkan peran utama dalam apoptosis yang diinduksi obat. Namun, Bax dan caspase-7 tidak terlibat dalam apoptosis yang diinduksi xanthorrhizol²².

Kandungan zat aktif lain berupa curcumin yang memiliki banyak manfaat medis seperti, such as antioksidan, antiproliferatif, antiangiogenik, antitumorigenik, dan antiinflamasi²³. Pada penelitian menggunakan sel kanker ganas, curcumin menunjukkan kemampuan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi caspase-3 dan caspase-9 juga faktor pro apoptosis lainnya²⁴. Curcumin juga ditemukan memiliki potensi mempromosikan apoptosis sel kanker payudara. Ekspresi protein apoptosis sel, seperti BCL2, BAX dan caspase 3, juga telah dianalisis. BCL2 adalah protein anti-apoptosis, sedangkan BAX adalah protein pro-apoptosis. Tingkat BCL2 nyata menurun dan tingkat BAX meningkat pada *cell line* T47D dan MCF7 yang mendapat perlakuan dengan curcumin selama 12 jam dengan

demikian, memicu pembelahan caspase 3 yang meningkat, hal ini menunjukkan bahwa curcumin dapat meningkatkan apoptosis melalui jalur mitokondria.. Curcumin memberikan efek antitumor yang kuat pada kanker payudara dengan menginduksi penghentian siklus sel pada fase G2 / M, kemungkinan diinduksi oleh penurunan ekspresi CDC25, CDC2, dan peningkatan ekspresi P21. Curcumin menghambat fosforilasi jalur sinyal Akt / mTOR, menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis BCL2, meningkatkan ekspresi protein apoptosis BAX, dan memicu pembelahan protein caspase 3 yang menyebabkan apoptosis sel²⁵

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol rimpang temulawak berpotensi sebagai agen kemopreventif untuk mencegah kanker serviks karena meningkatkan aktivitas apoptosis pada sel HeLa kanker serviks.
2. Potensi apoptosis sel yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol rimpang temulawak (curcuma xanthorrhiza, roxb) dengan dosis optimal yang dapat digunakan adalah IC50 yaitu $36.12 \pm 6.66 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian sitotoksitas ekstrak etanol rimpang temulawak (curcuma xanthorrhiza, roxb) terhadap sel HeLa kanker serviks secara in vivo.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menguji konsentrasi sampel secara akurat dan terperinci agar didapatkan dosis efektif sebagai agen apoptosis.
3. Perlu dilakukan penelitian menggunakan bahan herbal lain selain temulawak (curcuma xanthorrhiza, roxb)

4. Perlu dilakukan penelitian ekstrak (curcuma xanthorrhiza, roxb) pada sel kanker lainnya.

References

1. Rasyidi M. 2009. Epidemiologi Kanker Serviks, *Indonesian Journal of Cancer*, Vol.III, No. 3.
2. Kertia N, Sudarsono, Imono A, Mufrod, Catur E, Rahardjo P, Asdie A. 2005. Pengaruh Pemberian Kombinasi Minyak Atsiri Temulawak dan Ekstrak Kunyit Dibandingkan dengan Piroksikam terhadap Angka Leukosit Cairan Sendi Penderita Osteoarthritis Lutut. *Majalah Farmasi Indonesia*;. 16(3):155-161.
3. Oon SF, Nallappan M, Tee MT, Shohaimi S, Kassim NK, Sa'ariwijaya MSF, Chea YH. Xanthorrhizol.2015.a Review of its Pharmacological Activities and Anticancer Properties, *Cancer Cell International*; 2015. 15:100.
4. Handayani T, Sakinah S, Nallappan M, Pihie AHL.2007. Regulation of caspase 3-, Bcl-2- and Caspase-dependent Signaling Pathway in Xanthorrhizol-induced Apoptosis of HepG2 Hepatoma Cells, *Anticancer Research*;. 27: 965-972.
5. Jagetia GC, Aggarwal BB.2007. "Spicing Up" of the Immune System by Curcumin, *Journal of Clinical Immunology*.
6. Meye E.2009. Sitotoksitas dan Efek Ekstrak Etanol Kulit Buah Jambu Menté (Anacardium occidentale L.) Terhadap Sel Mieloma. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
7. CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center).2009. Preparasi Sampel untuk Flowcytometry.. Available from: <http://www.ccrcc.farmasi.ugm.ac.i d>
8. Rao MNA.1990. *Antioxydant Properties of Curcumin*, Departement of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Manipal, India.
9. Bose S, Panda AK, Mukherjee S, Sa G.2015. Curcumin and tumor immune-editing:resurrecting the immune system, *Cell Division*.
10. Kong F, Ye B, Cao J, Cai X, Lin L, Huang S, Huang W, Huang Z.2007. Curcumin Represses NLRP3Inflammasome Activation via TLR4/MyD88 /NF-κB and P2X7R Signaling in PMA-Induced Macrophages, *Frontier in Pharmacology*.
11. Leu DJ, Ataya R, Coiro J.2002. Assessing assessment strategies among the 50 states: Evaluating the literacies of our past or our future? Paper presented at the 18th National Reading Conference. Miami, FL.
12. CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center).2012. Uji Sitotoksik Metode MTT.Available from: <http://www.ccrcc.farmasi.ugm.ac.i d>
13. Handayani, Tri, dkk.2007. Regulation of p53-, Bcl-2- and Caspase-dependent Signaling Pathway in Xanthorrhizol-induced Apoptosis of HepG2 Hepatoma Cell, *Anticancer Research*, School of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, National University of Malaysia., Selangor.
14. Thornberry NA and Lazebnik Y.1998: Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
15. Cory S, Huang DC and Adams JM:2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*.
16. Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu HC, Xu M and Hsu YT: 2003. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome c release and Bax regulation. *Apoptosis*.
17. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD. 1997: The release of

HALAMAN PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

PENGARUH EKSTRAK ETANOL RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza, Roxb*) TERHADAP EKSPRESI GEN *CASPASE 3* PADA SEL HELA

Disusun oleh:

BHIMO AJI HERNOWO

20150310184

Telah disetujui dan diseminarkan pada tanggal 26 September 2018

Dosen Pembimbing

dr. Indrayanti Sp.PA

NIK : 19700810199709 173 029

Dosen Penguji

Dra. Yoni Astuti, M.Kes., Ph.D

NIK : 19660814199409 173 009

Mengetahui,

Kaprodi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta



Dr. dr. Sri Suniari, M.Kes

NIK : 19670513199609 173 019

Dekan

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta



Dr. dr. Wiwik Kusumawati, M.Kes

NIK : 19660527199609173018