

Selektivitas antikanker ekstrak kasar dan fraksi kolom biji *Momordica charantia* L. terhadap Sel Raji, HeLa dan T47D

Hersri Rochmad Parhardian¹, Sudjadi², Sofia Mubarika³

¹Program Studi Kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Bagian Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Parhardian, H.R., Sudjadi, Mubarika, S. – *Anticancer selectivity of Momordica charantia* L. Seeds Extract and Column Fraction on Raji, HeLa and T47D Cell Lines

Background: *Momordica charantia* L. has been used traditionally as medicinal plant in Indonesia. The seed extracts have active substances in the form of ribosome-inactivating proteins (RIPs). Almost all RIPs can eliminate virus infection and kill cancer cells. Some cancer cells like Raji cell line and HeLa cell line are derived from Burkitt's lymphoma and cervical carcinoma, respectively. Both cancers shows a striking association with Epstein-Barr Virus (EBV) and human papilloma virus (HPV). T47D cell line is derived from breast cancer and is not related to certain type of virus.

Objective: This study was focused on the effect of RIP from *M.charantia* L. on Raji, HeLa and T47D cell lines.

Methods: Crude extract from *M.charantia* L. seeds was dissolved in 0.15 M NaCl, and then precipitated with 30-60% saturated ammonium sulphate. Precipitant was then purified with column of CM-Sephrose CL-6B with 0.5 M NaCl gradient. Cell lines grown in growth media with crude extract and active fraction of column. Lethal Doses 50% (LD₅₀) was calculated directly for Raji cell line and used MTT for HeLa and T47D cell lines.

Results: The study shows that 0.25M NaCl column fraction containing 32kDa protein had an activity on DNA supercoiled cleavage. The difference of LD₅₀ between crude extract with 32kDa protein was not significant ($p > 0.05$) for Raji cell line and HeLa cell line, but there was significant difference for T47D cell line. T47D cell line shows DNA fragmentation as sign of apoptosis.

Conclusion: Raji cells shows more sensitive than T47D cell lines did, whereas HeLa cell line was resistant to the crude extract and 32kDa protein. In this work, the death of T47D cell line was estimated through apoptosis.

Key words: column fraction - *Momordica charantia* L. - Raji - T47D cell lines - apoptosis.

ABSTRAK

Parhardian, H.R., Sudjadi, Mubarika, S. – *Selektivitas antikanker ekstrak kasar dan fraksi kolom biji Momordica charantia* L. terhadap Sel Raji, HeLa dan T47D

Latar belakang: *Momordica charantia* L. telah lama digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia. Ekstrak biji *Momordica charantia* L. mempunyai senyawa aktif dalam wujud *ribosome-inactivating protein* (RIP). Hampir semua RIP dapat menghambat virus dan membunuh sel kanker. Beberapa sel kanker seperti sel Raji dan sel HeLa diturunkan dari limfoma Burkitt dan karsinoma leher rahim, yang terinfeksi virus seperti *Epstein-Barr virus* (EBV) dan *human papilloma virus* (HPV). Sel T47D berasal dari turunan sel kanker payudara yang tidak disebabkan oleh virus.

Tujuan: Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek RIP dari *M. charantia* L. terhadap sel Raji, HeLa, dan T47D.

Bahan dan cara: Ekstrak kasar dari biji *M.charantia* L. dilarutkan dalam NaCl 0,15M, dan diendapkan dengan 30-60% amonium sulfat jenuh. Endapan kemudian dimurnikan dengan kolom CM-Sepharose CL-6B menggunakan gradien NaCl 0,5M. Sel ditumbuhkan dalam medium pertumbuhan yang ditambahkan ekstrak kasar ataupun fraksi kolom. Dosis Kematian 50% (LD₅₀) dihitung secara langsung untuk Raji dan menggunakan MTT untuk sel HeLa dan T47D.

Hasil: Hasil menunjukkan bahwa fraksi kolom NaCl 0,25M mengandung protein berukuran 32kDa mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil. Tidak terdapat perbedaan LD₅₀ yang bermakna antara ekstrak kasar dengan protein 32kDa untuk sel Raji dan sel HeLa ($p > 0,05$), namun terdapat perbedaan LD₅₀ yang bermakna pada sel T47D.

Simpulan: Sel Raji lebih sensitif daripada sel T47D, sedang sel HeLa relatif resisten baik terhadap ekstrak kasar maupun protein 32kDa. Proses kematian sel T47D melalui proses apoptosis.

(B.I.Ked. Vol. 36, No.2: 83-88, 2004)

PENGANTAR

Kekayaan alam Indonesia menyimpan berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat obat. Pare (*Momordica charantia* L.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan untuk obat demam, flu, pembersih darah, peluruh haid, dan obat luka.¹ Protein dari *M.charantia* L. diketahui dapat menghambat sintesis protein dari sel retikulosit kelinci dan ribosom *Artemia salina*, seperti ditunjukkan oleh *Ribosom-inactivating Proteins* (RIP) lainnya.² Zat aktif yang disebut *momordin I* dan *momordin II* juga aktif dalam menghambat beberapa macam sel kanker.³ Protein dari tumbuhan ini dilaporkan dapat menghambat infeksi virus dan sel yang terinfeksi virus, lebih kuat daripada sel yang tidak terinfeksi virus.^{4,5} *Momordin* kemudian digolongkan dalam polinukleotida adenosin glikosidase karena dapat melepaskan adenin lebih dari satu pada DNA dan RNA.⁶ Kerusakan DNA menyebabkan siklus sel dapat terhenti sampai kematian sel.⁷

Sel Raji adalah *continuous cell line* yang diturunkan dari sel limfosit B penderita limfoma Burkitt, namun memiliki kerusakan pada *downstream* kaspase-3, yang menyebabkan sel tersebut tidak menunjukkan gambaran fragmentasi DNA.^{8,9} Sel HeLa adalah *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel serviks penderita kanker serviks, dan masih dapat diinduksi apoptosis,^{10,11} tetapi sel HeLa dilaporkan resisten terhadap *momordin*.³ Sel T47D adalah *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kelenjar mammae

yang bermetastasis ke pleura dari penderita kanker payudara.⁹

Efek sitotoksik ekstrak biji *M.charantia* L. belum diketahui apakah dapat menghambat sel Raji, dan sel T47D, dan pengaruh lama inkubasi pada sitotoksitas. Selain itu belum diketahui apakah kematian sel yang disebabkan oleh protein tersebut melalui apoptosis, nekrosis atau mekanisme lain.

Pada tulisan ini dilaporkan efek ekstrak kasar dan fraksi kolom dari biji *M.charantia* L. pada persentase kematian sel dan waktu inkubasi pada sel Raji. Juga dilaporkan efeknya pada persentase kematian sel HeLa dan T47D, serta gambaran kematian sel T47D oleh ekstrak kasar dan fraksi kolom biji *M.charantia* L.

BAHAN DAN CARA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hayati Universitas Gadjah Mada.

Bahan dan Alat

Bahan uji adalah ekstrak kasar. dan 32 kDa RIP yang diisolasi dari biji *M. charantia* L. Subyek uji adalah sel Raji, HeLa, T47D, dan pUC18 yang diperoleh dari stok Laboratorium Ilmu Hayati UGM. Bahan kimia dan media yang digunakan merupakan bahan standar yang biasa digunakan pada percobaan di laboratorium tersebut. Alat uji adalah mikroskop, elektroforesis gel agarosa, spektrofotometer, dan ELISA reader.

Cara Kerja

1. Isolasi 32 kDa RIP

Pembuatan ekstrak kasar dan pemurnian 32 kDa RIP biji *M. charantia L.* seperti yang dijelaskan oleh Parhardian *et al.*¹¹

2. Uji sitotoksisitas

Seratus mikroliter suspensi sel Raji dengan konsentrasi 3×10^4 sel / 100 μ l, masing-masing didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasikan bersama fraksi protein dengan satu seri kadar selama 24, 48, 36, dan 96 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C. Seratus μ l suspensi HeLa dan T47D dengan konsentrasi 3×10^4 sel/100 μ l, masing-masing didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasikan bersama fraksi protein dengan satu seri kadar selama 24 jam. Sebagai kontrol digunakan 100 μ l sel diinkubasi dalam medium RPMI 1640 dengan FBS 10% dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C.

- a. Metode penghitungan langsung. Pada akhir inkubasi, sejumlah 10 μ l suspensi sel Raji ditambah 10 μ l biru tripan diletakkan dalam hemositometer, dan dihitung sel hidup dan mati dibawah mikroskop. Sel hidup tampak berbentuk bulat, cemerlang dan intinya jernih. Persentase kematian dihitung dengan menghitung selisih sel hidup dalam kontrol dengan sel hidup dalam perlakuan dibagi jumlah sel hidup dalam kontrol dikalikan 100%. Harga LD₅₀ dihitung dengan metode Probit.
- b. Metode MTT. Untuk sel HeLa dan T47D, pada akhir inkubasi ke masing-masing sumuran ditambahkan 10 μ l (5mg/ml MTT) dalam media RPMI dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan pereaksi penghenti dan diinkubasi semalam. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550nm.

3. Uji apoptosis

Pada akhir inkubasi dengan medium pertumbuhan sebagai kontrol, sel T47D difiksasi dengan metanol selama 15 menit dengan volume 1:1, dibiarkan sampai kering dan ditambah dengan etidium bromida

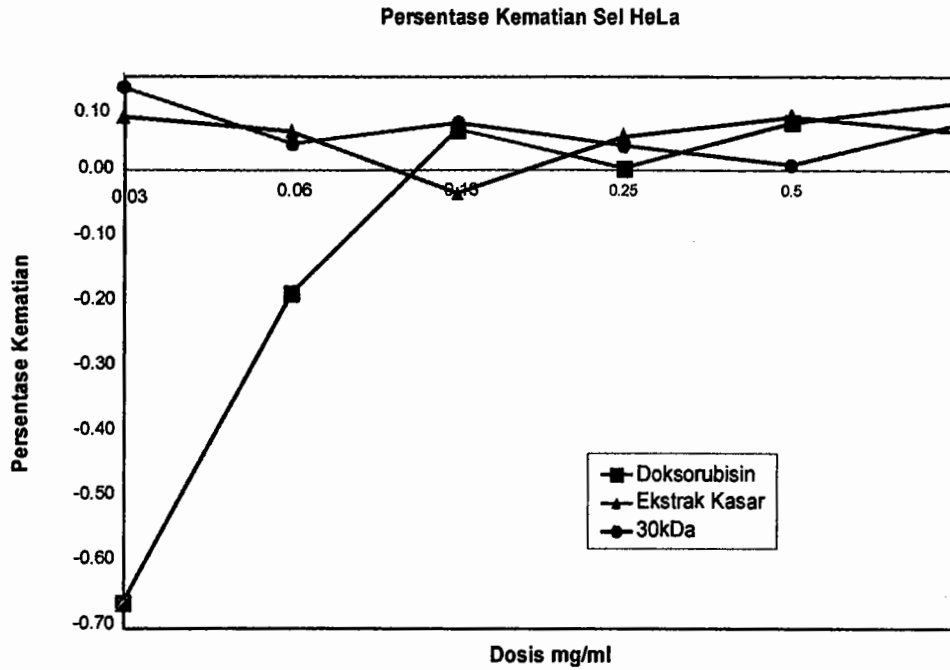
10ml. Sel yang mengalami apoptosis akan menampilkan fragmentasi DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

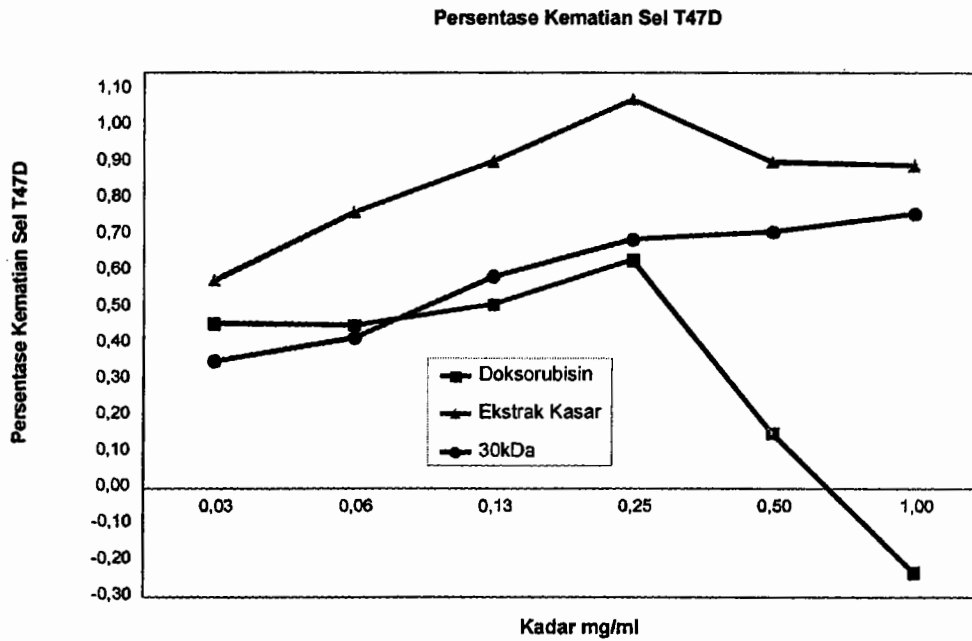
Sebelum dilakukan uji sitotoksik terhadap sel, ekstrak kasar dan 32 kDa RIP hasil pemurnian dari biji *M.charantia L* diuji terlebih dahulu kemampuannya memotong DNA superkoil untuk membuktikan bahwa ekstrak daqn 32 kDa protein masih mempunyai aktivitas.

Uji sitotoksisitas terhadap sel Raji telah dilaporkan sebelumnya¹¹ menunjukkan bahwa persentase kematian sel yang diberi perlakuan ekstrak kasar dan protein 32 kDa dengan dosis masing-masing 233,59 μ g/ml dan 109,62 μ g/ml. Perhitungan harga LD₅₀ pada uji sitotoksisitas ekstrak kasar dengan waktu 24 jam adalah 8,66 μ g/ml, lebih rendah dibanding LD₅₀ dari protein 32 kDa yaitu sebesar 15,31 μ g/ml, tetapi perbedaan kematian ini tidak bermakna ($p > 0,05$). Hal ini berarti bahwa di dalam ekstrak kasar terdapat senyawa lain yang juga mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan sel Raji.

Uji sitotoksisitas terhadap sel HeLa dan T47D dilakukan dengan menggunakan metode MTT untuk ekstrak kasar dan protein 32 kDa dengan inkubasi 24 jam memberikan gambaran seperti pada GAMBAR 1 dan 2. Sel HeLa ternyata resisten terhadap ekstrak kasar dan protein 32 kDa dengan persentase kematian pada dosis tertinggi 500 μ g/ml sebesar 8,22%, sedangkan protein 32 kDa menimbulkan kematian 12,88%. Perbedaan nilai ini tidak bermakna untuk $p > 0,05$. Hal ini sesuai dengan laporan Barbieri *et al*⁶ yang menyatakan bahwa sel HeLa resisten terhadap momordin dari *M.charantia L*, gelonin dan PAP-S. Walaupun demikian sel HeLa ini menunjukkan peka terhadap penggunaan protein dari *Mirabilis jalapa L*¹². Pada GAMBAR 2 nampak persentase kematian sel T47D meningkat sesuai dengan kenaikan kadar ekstrak. Ekstrak kasar pada dosis terendah sebesar 31 μ g/ml rata-rata persentase kematian 57,66%. Harga LD₅₀ protein 32 kDa adalah 87,38 μ g/ml. Perbedaan nilai ini bermakna untuk $p > 0,05$. Perbedaan dosis kematian ini mungkin disebabkan oleh protein 32 kDa yang telah tersimpan lama, sedangkan ekstrak kasar relatif baru. Kenaikan persentase kematian ekstrak kasar pada dosis 250



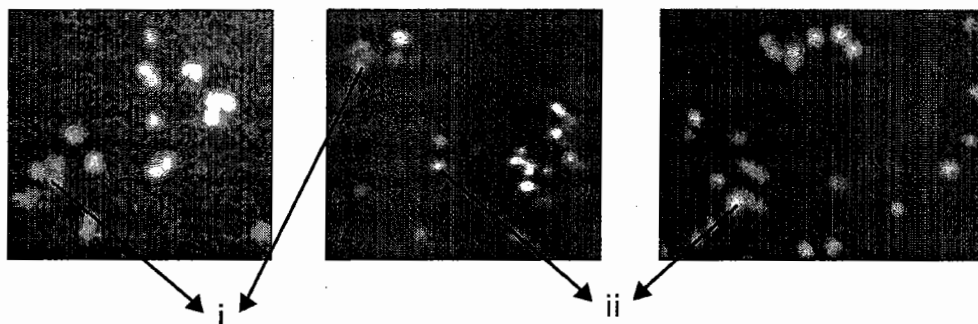
GAMBAR 1. Diagram kematian sel HeLa oleh protein 32kDa biji *M. charantia* L. dengan waktu inkubasi 24 jam



GAMBAR 2. Diagram kematian sel T47D oleh protein 32kDa biji *M. charantia* L. dengan waktu inkubasi 24 jam.

$\mu\text{g/ml}$ disebabkan kontrol ekstrak kasar yang memberikan nilai tinggi, bisa disebabkan pencucian sumuran yang kurang bersih. Walaupun demikian aktivitas protein 32 kDa menghambat pertumbuhan sel paling kuat pada sel Raji diikuti sel T47D, sedangkan sel HeLa relatif resisten terhadap protein 32 kDa. Perbedaan selektivitas ini disebabkan oleh perbedaan reseptor pada masing-masing sel dan juga jenis protein yang digunakan. Sel Raji mempunyai membran yang lebih permeabel adanya virus EBV.¹³ Sel T47D mempunyai reseptor $\alpha 2\text{MR}$ yang bertanggungjawab atas masuknya RIP, saporin, dan rantai A ricin ke dalam sel¹⁴ Protein 32 kDa ini mungkin tidak dapat menempel pada sel HeLa seperti halnya momordin, gelonin, dan PAPS.¹¹ Sudjadi *et al*¹⁵ melaporkan bahwa protein MJ-30 dari daun *M. jalapa L* lebih aktif menghambat pertumbuhan sel T47D daripada sel Raji dan HeLa.

Sel Raji diketahui resisten terhadap apoptosis,^{8,16} sedangkan dari percobaan sitotoksik sel HeLa menunjukkan resisten terhadap RIP dari *M. charantia* sehingga tidak dapat dilakukan uji apoptosis, walaupun Sudjadi *et al*¹² dan Ikawati *et al*¹⁶ menunjukkan bahwa proses kematian sel HeLa karena RIP dari *M. jalapa L* melalui proses apoptosis. Untuk mengetahui mekanisme kematian sel T47D dilakukan uji apoptosis dengan metode etidium bromida. Sel yang diperlakukan dengan ekstrak kasar dan protein 32 kDa menunjukkan inti sel yang terpecah lebih dari dua, tanpa disertai pemisahan sitoplasma, ini menunjukkan gambaran apoptosis (GAMBAR 3). Fragmentasi DNA tersebut karena proses apoptosis yang diinduksi oleh RIP melalui aktivitas RNA N-glikosidase yang jika mencapai 90% kadar normalnya akan mendorong sel menginduksi proses apoptosis.¹⁷



GAMBAR 3. Fotomikroskopis sel T47D pada pengecatan etidium bromid
(a) Pengaruh pemberian ekstrak kasar 30 $\mu\text{g/ml}$ (b) Fraksi 30kDa 200 $\mu\text{g/ml}$ (c) Sel kontrol
i : Sel yang kemungkinan mengalami apoptosis
ii: Sel yang normal

SIMPULAN

Dari penelitian disimpulkan bahwa ekstrak kasar dan protein 32kDa bersifat sitotoksik terhadap sel Raji relatif lebih kuat daripada sel T47D, dan relatif tidak sitotoksik terhadap sel HeLa. Ekstrak kasar dan protein 32kDa tersebut menyebabkan kematian sel T47D melalui proses apoptosis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan jazaakalah khairon kepada Dra. Sismindari, Apt, MS, PhD. atas bantuan yang diberikan sebelum, semasa, dan

setelah penelitian ini dan Drs. Edy Meiyanto, PhD. atas bantuan sel T47D.

KEPUSTAKAAN

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Tanaman Obat Indonesia Jilid I. 1985; 63.
2. Barbieri L, Zamboni M, Lorenzoni E, Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter pear melon). J Biochem. 1980; 186: 443-52.
3. Barbieri L, Battelli ML, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. Biochim Biophys Act. 1993; 1154: 237-82.

4. Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Bourinbaier AS, Chen H, Kung H. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1995; 92: 8818-22.
5. Praseno, Saleh S, Rintiswati N. Antiviral activity of *Momordica charantia* : a preliminary study on in vitro anti herpes simplex virus. *BIKed.* 1997; 29 (3):
6. Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. Polynucleotide : Adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: Effect on DNA, RNA and Poly(A). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25 (3): 518-22.
7. Leoncini L, Lazzi S, Bellan C, Tosi P. Cell kinetics and cell cycle regulation in lymphomas. *J Clin Path.* 2002; 55(9): 648-55.
8. Kawabata Y, Hirokawa M, Kitabayashi A, Horiuchi T, Kuroki J, Miura AB. Defective apoptotic signal transduction pathway downstream of caspase-3 in human B-lymphoma cells: A novel mechanism of nuclear apoptosis resistance. *Blood.* 1999; 94 (10): 3523-30.
9. American Type Culture Collection. 2003. <http://www.atcc.org>
10. Skloot R. Henrietta's Dance. *Johns Hopkins Magazine.* 2000
11. Parhardian HR, Sudjadi, Mubarika S. Purification and its cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia* L. Seeds on Raji cell line, *IndonJBioTech* (Submitted), 2004.
12. Sudjadi, Ikawati Z, Sismindari, Arini KF. Efek fraksi protein dari biji *Mirabilis jalapa* L. pada proses kematian kultur sel HeLa. *Biologi.* 2002; 2(13): 743-56.
13. Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. *Biotechnology.* 1992; 10 (4): 405-12.
14. Cavallaro U, Nykjaer A, Nielsen M, Soria MR. Abstract: Alpha 2-macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem.* 1995; 232 (1): 165-71.
15. Sudjadi dan Ikawati Z. Efek sitotoksik protein 30 kD dari daun *Mirabilis jalapa* L. pada kultur sel HeLa, myeloma, SiHa, Vero dan mononuklear darah perifer dan uji stabilitasnya, Laporan Penelitian Project Grant, QUE Project 2002/2003, Fakultas Farmasi UGM, 2003.
16. Ikawati Z, Sudjadi, Sismindari, Sari RP, Maulani N. Efek fraksi protein sejenis RIP (*Ribosome-inactivating protein*) yang diisolasi dari akar *Mirabilis jalapa* L. terhadap proses kematian kultur sel HeLa dan Raji, *Biologi,* 2002; 2: 769-83.
17. Olmo N, Turnay J, de Buitrago GG, de Silanes IL, Gavilanes JG, Lizarbe MA. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin : Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 2113-23.