

Efek Apoptosis Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Spirogyra Sp.*) Terhadap Ekspresi *Caspase-3* Dan *Bcl-2* Pada Sel T47d

Wahyu Widyaningsih, Nina Salamah, Dwi Fitriani, Hari Susanti

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Jl Prof Soepomo, Janturan, Yogyakarta

Email:Widyaningsihwahyu@yahoo.com

Abstract

Breast cancer is the leading cause of death in women in many parts of the world. Green algae (*Spirogyra sp.*) is one of the medicinal plants used in traditional medicine for the treatment of cancer. Green algae (*Spirogyra sp.*) has an active substance content in the form of melatonin. Melatonin is a compound that has been examined by researchers world sci as anticancer drugs and antioxidants. This study aims to determine the apoptotic effects of ethanol extract of green algae (*Spirogyra sp.*) on the expression of *caspase-3* and *Bcl-2* in T47D cells. Green algae powder was extracted by using a Soxhlet apparatus with 96% ethanol. This study used three groups: control cells, the concentration of ethanol extract of green algae 247.668 µg/ml and 123.834 µg/ml. To ensure the expression of *caspase-3* and *Bcl-2* test indirect immunocytochemistry. The results show there is an increased expression of *caspase-3* and decrease in *Bcl-2* when compared with control cells at a concentration of 123.834 µg/ml. The ethanol extract of green algae (*Spirogyra sp.*) has effect as an inducer of apoptosis at a concentration of 123.834 µg/ml.

Keywords: Green algae, *Spirogyra sp.*, *caspase-3*, *Bcl-2*, T47D cells, immunocytochemistry.

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali (Katzung, 1998). Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia.

Ganggang telah terbukti memiliki aktifitas farmakologi sebagai anti bakteri dan bakterisidal (Taskin et al., 2007), anti inflamasi dan anti tumor. Ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) merupakan tanaman dengan kandungan zat aktif berupa *phytomelatonin* (Kolar et al., 2001). *Phytomelatonin* adalah senyawa *melatonin* yang terdapat dalam tanaman (*phyto*).

Salah satu jenis sel kanker payudara adalah T47D (Fillmore et al., 2008). Sel tersebut selain mengekspresikan estrogen reseptor positif juga mengekspresikan progesterone reseptor positif dan p53 yang termutasi (Schafer et al., 2000). Sekitar 50% kanker payudara disebabkan karena p53 yang termutasi sehingga sel T47D berperan sebagai salah satu model kanker payudara yang dapat menunjukkan efek sitotoksik suatu senyawa.

Salah satu ciri sel kanker adalah mampu menghindari apoptosis (Hanahan et al., 2000). Beberapa anggota famili *Bcl-2* misal *Bcl-2*, *Bcl-xl* menghambat apoptosis dengan pencegahan pembebasan sitokrom C, sedangkan yang lain seperti *Bad*, *Bax*, dan *Bid*, mencetuskan apoptosis dengan mendorong pelepasan sitokrom C. Proses apoptosis sendiri memiliki dua jalur yaitu melalui jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Aktivasi apoptosis baik jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik akan berujung pada aktivasi *caspase-3* sebagai *caspase* eksekutor. Apabila *caspase-3* telah teraktivasi akan terjadi determinasi yang tidak terhindarkan dari kematian sel sehingga terjadi apoptosis. *Caspase-3* diperlukan pada fase eksekusi pada substrat apoptosis, yang selanjutnya akan menyebabkan fragmentasi DNA dan terbentuk bahan jasad apoptosis (Cryns et al., 1998). Oleh karena

itu perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) terhadap ekspresi *caspase-3* dan *Bcl-2* pada sel T47D untuk mengetahui kemampuannya sebagai penginduksi apoptosis.

METODE PENELITIAN

Alat. Alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari: alat Soxhlet, *waterbath*, LAF (*Laminer air flow*), *tissue culture flask*, *incubator CO₂*, *vortex*, *conical tube 15 ml*, *hemocytometer*, *24-plate well*.

Bahan. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ganggang hijau, etanol 96%, sel T47D (dari FKU UGM), DMSO, media kultur (RPMI), tripsin, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*)-0,5 % fungison-2% antibiotik penisilin dan streptomisin (GIBCO), PBS, *aquadest*, reagen imunositokimia meliputi methanol, H₂O₂ : air (1:9), *blocking serum*, antibodi primer untuk antigen yang akan diamati *caspase-3* dan *Bcl-2*, antibodi sekunder (biotin), streptavidin, DAB, meyer hematosiklin, alkohol 95% dan *xylol*.

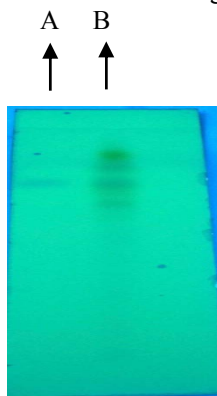
Penyiapan Ekstrak Ganggang Hijau. Tanaman ganggang hijau dibersihkan. Ganggang diserbuk, serbuk diekstraksi dengan alat Soxhlet menggunakan pelarut etanol 96%.

Identifikasi Senyawa Melatonin pada Larutan Uji. Identifikasi senyawa melatonin dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Sampel dan senyawa melatonin standar ditotolkan pada *plate* silika gel GF. Fase gerak yang digunakan adalah fase atas *n*-butanol : asam asetat : air (12 : 3 : 5), Rf bercak hasil elusi dihitung dengan pengamatan dibawah sinar UV⁸.

Pemilihan Konsentrasi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) memiliki IC₅₀ sebesar 247,668 µg/ml pada sel T47D. oleh karena itu

digunakanlah konsentrasi IC₅₀ (247,668 µg/ml) dan ½ IC₅₀ (123,834 µg/ml).

Uji apoptosis. Sel (kepadatan 3 x 10⁴ sel/semuran) sebanyak 2 ml ditanam pada *coverslip* dalam mikropate 24 sumuran kemudian ditunggu 15 menit lalu diberi penambahan media RPMI sebanyak 300 µl, inkubasi selama 24 jam dalam incubator CO₂. Tambahkan ekstrak etanol ganggang hijau sesuai dengan konsentrasi IC₅₀ dan ½ IC₅₀ yaitu berturut-turut 247,668 µg/ml dan 123,834 µg/ml dan diinkubasi selama 24 jam dalam incubator CO₂. Medium dibuang lalu *coverslips (poly-l-lysine slide)* dicuci dengan PBS secukupnya kemudian *coverslips* diambil dari dalam sumuran dan difiksasi dengan methanol masing-masing 300 µl selama 10 menit. Metanol dibuang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali @500 µl selama 2 menit, PBS dibuang kemudian dicuci dengan aquadest sebanyak 2 kali @500 µl selama 2 menit. Aquades dibuang kemudian dibersihkan. Langkah selanjutnya menambahkan H₂O₂ (1: 9 dalam aquades) @ 300 µl selama 10 menit, H₂O₂ dibuang kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak dua kali @500 µl selama 2 menit, kemudian PBS dibuang. selanjutnya *Coverslips* ditambahkan 100 µl *blocking serume* selama 10 menit RT. *Coverslips* lalu diberi penambahan antibody primer caspase-3 sebanyak 100 µl lalu ditunggu/didiamkan selama satu jam pada suhu kamar. Hasil inkubasi dengan antibody *caspase-3* dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 2 menit @500 µl, tambahkan antibody sekunder @ 100 µl selama 20 menit RT (Trekkte Link). *Coverslips* dicuci menggunakan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 2 menit @500 µl. Kemudian diberikan @100 µl label selama 10 menit RT (TrekAvidin-HRP), dicuci dengan PBS selama 2 menit sebanyak 2 kali @500 µl. *Coverslips* selanjutnya diberi penambahan DAB dan ditunggu hingga 2 menit @100 µl (DAB substrat sel (1:200) setelah 2 menit DAB dibuang dan dicuci dengan aquadest sebanyak 2 kali @500 µl selama 2 menit setelah 2 menit aquadest dibuang. *Coverslips* direndam dalam Mayer-hematoksilin selama 5 menit @100 µl setelah 5 menit kemudian dibuang. Setelah itu dilakukan pencucian dengan aquadest hingga bersih (warna biru hilang) dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan alcohol absolut dan



Gambar. 1 Hasil identifikasi senyawa melatonin dengan Kromatografi Lapis Tipis.
(A): standard melatonin (B): larutan sampel

penjernihan dengan *xylol*. Setelah kering *coverslips* ditutup dengan kaca penutup menggunakan perekat (*mounting media*) dan diamati dengan mikroskop cahaya untuk melihat ekspresi, *caspase-3*.

Analisis Data. Ekspresi protein diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat, sedangkan yang tidak berekspresi memberikan warna ungu. Data ditentukan dengan menghitung rata-rata persen ekspresi *caspase-3* terhadap jumlah keseluruhan sel.

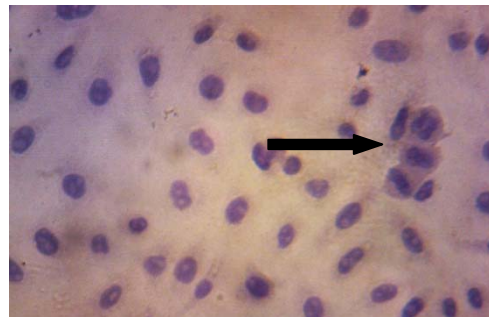
Data yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persen ekspresi gen (\%)} = \frac{\text{jumlah sel terekspresi}}{\text{jumlah seluruh sel}} \times 100\%$$

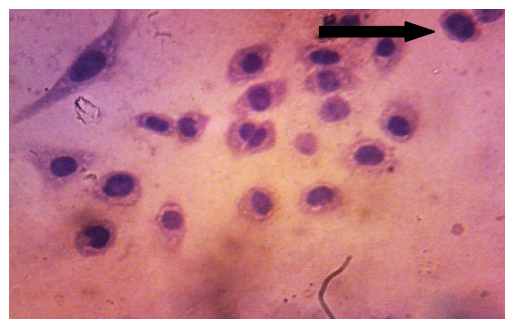
HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol. Hasil bercak yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 1. Pada foto hasil elusi terlihat bahwa terdapat satu bercak pada standard dan terdapat beberapa bercak pada larutan sampel. Namun, salah satu bercak sampel memiliki harga R_f yang sama dengan harga R_f bercak standar, yaitu sebesar 0,72. Hal ini menunjukkan bahwa salah satu senyawa yang terdapat dalam larutan sampel adalah senyawa melatonin.

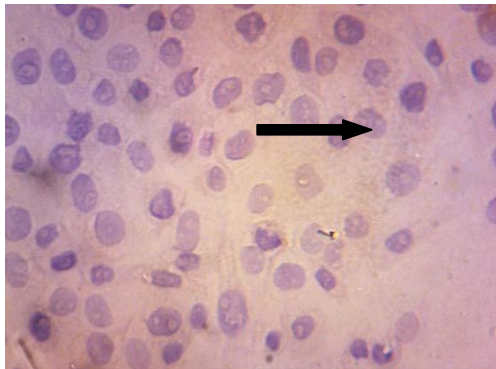
Pengamatan Imunositokimia pada *caspase-3* dan Bcl-2. Hasil pengamatan imunositokimia yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 2,3 dan tabel I.



(a)



(b)



(c)

Gambar. 2 Foto mikroskopis hasil imunositokimia *caspase-3* pada sel T47D

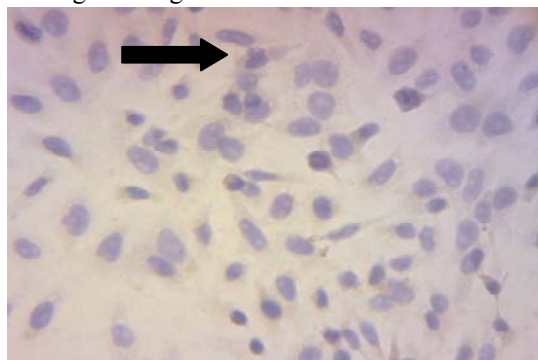
(a) kontrol sel (b) pemberian ekstrak etanol konsentrasi 123. 834 µg/ml (c) 247.668 µg/ml

➡ tidak mengekspresikan
➡ mengekspresikan

Tabel I. Ekspresi *caspase-3* dan Bcl-2 pada sel T47D

Perlakuan	% Rata-rata ekspresi <i>Caspase-3</i>	% Rata-rata ekspresi Bcl-2
Kontrol Sel	22.19 %	16.07 %
123. 834 µg/ml	47.06 % *	6.97 % **
247.668 µg/ml	20.86 %	54.82 %

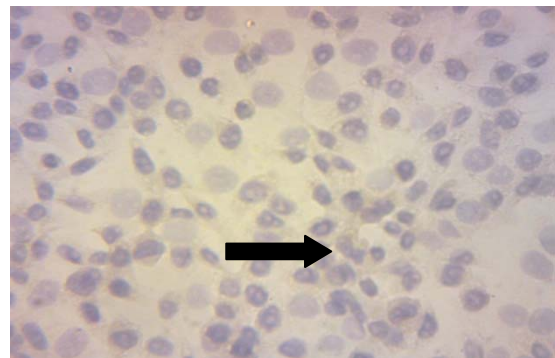
*terjadi peningkatan ekspresi *caspase-3* berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol sel ** terjadi penurunan Bcl-2 berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol sel



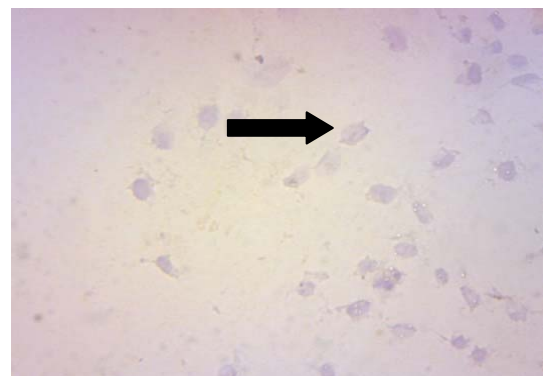
(a)

Masing-masing konsentrasi pada pemberian ekstrak etanol ganggang hijau memperlihatkan peningkatan ekspresi *caspase-3* dan penurunan Bcl-2 yang berbeda hal ini mengindikasikan bahwa setiap konsentrasi menunjukkan respon yang berbeda terhadap ekspresi *caspase-3* dan Bcl-2 yang berarti setiap konsentrasi tersebut memiliki respon terhadap apoptosis yang berbeda pula. Namun jika dibandingkan antara kedua konsentrasi tersebut pada konsentrasi 247.668 µg/ml mengalami penurunan ekspresi *caspase-3* dan peningkatan Bcl-2 jika dibandingkan dengan konsentrasi 123.834 µg/ml hal ini berarti dengan konsentrasi yang lebih kecil dapat meningkatkan

Pada kelompok kontrol sel sendiri memperlihatkan adanya ekspresi *caspase-3* yang berarti secara alamiah peran *caspase-3* terekspresikan dalam sel-sel kanker.



(b)



Gambar. 3 foto mikroskopis hasil imunositokimia Bcl-2 pada sel T47D (a) kontrol sel (b) pemberian ekstrak etanol konsentrasi 123. 834 µg/ml (c) 247.668 µg/ml

➡ Tidak mengekspresikan ➡ mengekspresikan

ekspresi *caspase-3* dan menurunkan Bcl-2 lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih besar hal ini dapat disebabkan karena kemungkinan ada sifat dari senyawa alam yang tidak dapat di duga. Selain hal tersebut dapat pula disebabkan karena konsentrasi 247.668 µg/ml yang besar menyebabkan tidak signifikan dalam memacu fungsi apoptosis pada sel T47D dimana menurut Kamuhabwa *et al.*, 2000, pada konsentrasi yang lebih kecil potensi sitotoksik suatu senyawa lebih besar.

Gen Bcl-2 terletak pada kromosom 18 dan mengkode protein Bcl-2 (25-26 kDa) yang merupakan protein regulator pelepasan *cytochrome c* (cyto c) dari mitokondria, salah satu tahapan dalam proses apoptosis sel. Bcl-2 akan menghambat pelepasan cyto c dari mitokondria ke sitosol, cyto c tidak akan berikatan dengan APAF-1 dan tidak terbentuk apoptosome yang berakibat pada tidak terjadinya apoptosis, sehingga overekspresi Bcl-2 dapat menyebabkan sel resisten terhadap apoptosis. Oleh karena itu, ekspresi protein Bcl-2 merupakan hal yang penting dalam pengaturan apoptosis yang menentukan pertumbuhan kanker.

Mekanisme melatonin dalam meningkatkan fungsi apoptosis pada sel kanker yaitu dengan beberapa cara

yaitu diantaranya dengan menghambat aktifitas telomerase dengan mengurangi panjang telomer sehingga menyebabkan apoptosis sel kanker, ataupun dengan cara memodulasi ekspresi gen supresor tumor p53 yang dapat memacu terjadinya apoptosis (Ravindra et al., 2006).

Jalur kematian (apoptosis) itu sendiri dapat melalui jalur ekstrinsik, yakni dengan melibatkan metabolit sekunder pada ganggang hijau untuk menginduksi *death ligand* untuk berikatan dengan *death receptor*, sehingga memodulasi *procaspase-8* yang kemudian membentuk *death-inducing signaling complex* (DISC). Kompleks ini menyebabkan *caspase-8* teraktivasi, yang selanjutnya mampu mengaktivasi *caspase-3* melalui pemotongan segmen tertentu dari *procaspase-3*. Aktivasi *caspase-3* juga dapat melalui jalur intrinsik yang melibatkan *caspase-9*. Aktivasi p53 oleh beberapa faktor (misalnya stress oksidatif) akan memodulasi keluarnya protein *proapoptotic* pada mitokondria seperti BAX dan BAK. Kemudian protein ini akan menstimulasi keluarnya cytochrome-c dari intermembran mitokondria lalu mengaktivasi Apaf-1 yang membentuk suatu kompleks heptamerik. Kompleks ini memodulasi *procaspase-9* dan mengaktifkannya, selanjutnya *caspase-9* akan mengaktivasi *caspase-3* (Albert et al., 2008).

Penelitian yang dilakukan Suzuki et al., 1998, menunjukkan aktivitas apoptosis *caspase-3* melalui jalur ekstrinsik. *Caspase-3* yang aktif menunjukkan aktivitas dalam pembelahan DEVD-MCA, tetapi aktivitasnya menurun oleh penambahan protein sitoplasmik sel HepG2 utuh. Hasil ini menunjukkan bahwa penekan endogen *Fas-mediated* apoptosis melokalisasi fraksi sitoplasma dalam sel HepG2 dan langsung menghambat aktivasi *caspase-3*. Penghambatan langsung ini akan mengaktifkan *caspase-3* yang mirip dengan aktivitas ILP (*Isolated limb perfusion*) (Deveraux et al., 1997). *Isolated limb perfusion* mencegah *Fas-mediated* apoptosis melalui interaksi langsung dengan *caspase-3* yang aktif (Suzuki et al., 1998).

Aktivasi *caspase-3* melalui jalur intrinsik juga dapat terjadi. Menurut Kluza et al., 2007, alkaloid memacu apoptosis dengan meningkatkan permeabilitas membran mitokondria sehingga terjadi pelepasan sitokrom-C menuju sitosol sehingga dapat terjadi proses apoptosis.

Kesimpulan. Bahwa ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra* sp.) memiliki efek sebagai penginduksi apoptosis pada konsentrasi 123.834 µg/ml dengan parameter peningkatan ekspresi *caspase-3* dan penurunan ekspresi Bcl-2.

Ucapan Terima Kasih. Kepada Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui program hibah unggulan perguruan tinggi tahun 2012/2013.

DAFTAR PUSTAKA

Albert B, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W, 2008. *Molecular biology of the cell*, Fifth Edition, Garland Science : Oxford. p : 1115-1118, 1120.

- Cryns V, Yuan J, 1998. Proteases to die for. *Genes Dev*, 12: 1551-1570.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen G.S., and Reed, J.C., 1997, X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388 (6639): 300-304.
- Fillmore CM, Charlotte K, 2008. Human breast cancer cell lines contain stem like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy, *Breast Cancer Research*, Vol 10, No 2: 1-13.
- Hanahan D, Weinberg PA, 2000, The Hallmarks of Cancer Cell, *Departement of Biochemistry And Biophysics And Hormone Research Institute, University Of California, San Fransisco*, 57-70.
- Katzung BG, 1998. *Basic and Clinical Pharmacology*, Edisi VI, diterjemahkan oleh Binawati HK, Budi I, dkk, Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta, Hal 857, 858.
- Kamuhabwa A, Nshimo C, De Witte P, 2000. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in tanzani tradisional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 70(2): 143-149.
- Kluza J, Clark AM, Bailly C, Apoptosis induced by the alkaloid sampangine in HL-60 leukemia cells, *Annals of The New York Academy ofsciences*, 1010(1) : 331-334.
- Kolar J, Machanckova I. 2001. Occurrence and possible function of melatonin in plants. *Endocytobiosis and Cell Res* 14 (1) : 75-84.
- Lumongga F, 2008. *Apoptosis*, Departemen patologi anatomi fakultas kedokteran universitas sumatera utara, Medan.
- Prabowo A, 2009. Pemanfaatan phytomelatonin ganggang hijau (*Spirogyra* sp.) sebagai cancer activity inhibitor dari induksi logam berat, *PKM*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR, 2006. Melatonin In Pathogenesis and Therapy of Cancer. *Indian J Med Sci*, 60 (12): 523-535.
- Schafer JMG, Eun SL, Ruth M, O'Regan KYV, Craig, J, 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, Vol. 6: 4373-4380.
- Suzuki A, Yumi T, Kouichi A, Takashi A, Masayuki, M, 1998. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of Caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21 WAF1 and IAP gene family ILP, *Oncogene*, 17, 93-939.
- Taskin E, Kurt O, 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology* 6(24) 274-275.
- Utami S, 2007. Peran Kaspase pada Apoptosis sebagai Salah Satu Usaha dalam Kemoterapi Kanker, *JKM*, 32(1): 83-98.