

EFEK SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERATIF KUERSETIN PADA SEL KANKER KOLON WiDrArif Wirahadi Kusuma, Nunuk Aries Nurulita^{*}, Dwi Hartanti

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto

*Korespondensi: nunuknurulita@yahoo.com**Abstrak**

Kanker kolon merupakan penyakit salah satu penyakit yang banyak mengakibatkan kematian. Usaha penyembuhan kanker kolon melalui pembedahan kemoterapi dan radioterapi pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang efektif. Hal ini mengakibatkan banyak dijumpai cara pengobatan alternatif antara lain menggunakan bahan dari alam. Salah satu bahan dari alam tersebut adalah kuersetin. Kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang dikenal memiliki efek antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dan antiproliferatif kuersetin terhadap sel kanker kolon WiDr. Uji sitotoksik kuersetin dilakukan menggunakan metode MTT. Hasil Uji sitotoksik menunjukkan bahwa IC_{50} kuersetin terhadap sel WiDr adalah 1046 μ M. Pengamatan kinetika proliferasi sel WiDr yang diberi perlakuan kuersetin menggunakan metode penghitungan langsung dilakukan pada jam ke 0, 24, 48 dan 72. Pada pengamatan morfologi sel, setelah dilakukan pengecatan menunjukkan adanya fenomena apoptosis pada sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kuersetin memiliki efek sitotoksik dan antiproliferatif pada sel kanker WiDr.

Kata Kunci : Kuersetin, WiDr, Sitotoksik, Antiproliferatif

Abstract

Colon cancer is one disease that many result in death. The of colon cancer cure through surgery chemotherapy and radiotherapy are generally not able to provide effective results. This caused many found ways to use alternative medicine among other materials from nature. One of these natural substances are quercetin. Quercetin is a flavonoid compounds are known to have anticancer effects. This study aimed to determine the effect of cytotoxic and antiproliferatif quercetin against colon cancer WiDr cells. Quercetin cytotoxic test was carried out using MTT method. Test results showed that the cytotoxic IC_{50} of quercetin against WiDr cells was 1046 μ M. WiDr cell proliferation kinetics observation that quercetin treated using the method of direct calculation done at 0, 24, 48 and 72. In the observation of cell morphology, after the painting shows the phenomenon of apoptosis in colon cancer cell WiDr. The results showed that quercetin has cytotoxic and antiproliferative effects on cancer cells WiDr.

Keywords : Quercetin, WiDr, Cytotoxic, Antiproliferative.

PENDAHULUAN

Kanker kolon merupakan salah satu penyebab kematian ketiga terbesar pada pria dan wanita di Amerika. *The American Cancer Society* (2005) memperkirakan pada tahun 2005 terdapat sekitar 48.290 kasus baru pada pria dan 56.660 kasus baru pada wanita. Di Amerika pada tahun 1998–2000 hanya 1 dari 17 pria penderita kanker kolon yang berpeluang untuk hidup dan hanya 1 dari 18 pada wanita (*American Cancer Society*, 2004). Sel kanker kolon dapat menghindari mekanisme kematian sel yang terprogram (apoptosis) sehingga menyebabkan pertumbuhan sel kanker secara tidak terkontrol.

Pengobatan secara konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker antara lain dengan cara pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku, 2002). Namun, terapi kanker secara pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sementara pengobatan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping meskipun pengobatan kemoterapi mampu mengeluarkan semua tumor (Hawariah, 1998). Oleh karena itu, usaha pencarian agen kemoterapi dari bahan

alami yang memiliki target aksi pada gen pengatur pertumbuhan atau proliferasi sel dengan efek samping minimum sangat diperlukan dalam pengobatan penyakit kanker.

Salah satu bahan alami yang sering digunakan dalam pengobatan penyakit kanker ialah kuersetin, suatu senyawa golongan flavonoid yang sangat banyak terdapat di alam dan seringkali ditemukan di apel, bawang putih, teh hitam dan anggur merah (Hollman *et al.*, 1997). Pada penelitiannya Eun *et al* (2008) menyebutkan bahwa kuersetin secara signifikan mampu menghambat proliferasi sel dan menginduksi *cell cycle arrest* serta apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB-453. Namun sejauh ini belum ada penelitian yang melaporkan potensi antikanker dari kuersetin terhadap sel kanker kolon WiDr. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi kuersetin sebagai antikanker baik melalui efek sitotoksik maupun dengan penghambatan kinetika proliferasi

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Kuersetin (Nomor CAS 117-39-5, Nama IUPAC 3, 5, 7, 3', 4'-

pentahydroxyflavone) (Sigma). Sel kanker kolon *WiDr* merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi, UGM. Medium yang digunakan adalah Medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) yang mengandung garam organik, asam amino, vitamin, gula dan tambahan yang lain. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tripsin-EDTA 0,25% (Gibco), *Reagen MTT* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), sodium dodesil sulfat (SDS) (Merck) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck), *Reagen etidium bromide-akridin oranye (EA)*, *Phosphat Buffer Saline (PBS) 1X pH 7,4*.

Alat yang digunakan untuk kerja in vitro (uji sitotoksik, pengamatan apoptosis, kinetika proliferasi sel) antara lain, perlengkapan perlindungan diri (jas lab, masker, sarung tangan), *Purifier class II biosafety cabinet* (Labconco), inkubator CO₂ (Heraeus), *tissue culture flask/disk* (Iwaki), 96 well plate (Iwaki), 24 well plate (Iwaki), *haemocytometer* (Nebauer), *ELISA reader* (Bio-Rad), mikroskop fluoresens (Carl Zeiss), mikroskop inverted (Carl Zeiss), kamera digital.

Jalannya Penelitian

Preparasi sel

Semua alat yang digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu. Sel *WiDr* diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian segera dicairkan dalam penangas air 37°C. Ampul disemprot dengan etanol dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical* steril yang telah diisi dengan media kultur. Suspensi sel disentrifus selama beberapa menit, kemudian supernatan dibuang, diganti dengan media kultur yang baru dan disuspensikan perlahan sampai homogen. Sel ditumbuhkan dalam *tissue culture disk* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, dilakukan penggantian media kultur, kemudian sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci PBS 2 kali. Sel ditambah tripsin-EDTA 0,25% untuk melepas sel dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam incubator CO₂. Kemudian ditambahkan media kultur dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *flask*. Suspensi sel kemudian kemudian ditransfer ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* dan *cell*

counter lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai kebutuhan.

Pembuatan larutan uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan 15 mg kuersetin dalam 500 μ L DMSO + 500 μ L PBS sehingga diperoleh stok 40.000 μ M. dari larutan stok dibuat seri konsentrasi 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 μ M dalam media kultur RPMI untuk uji sitotoksik. Pekerjaan ini dilakukan di dalam LAF.

Uji sitotoksik menggunakan metode MTT

Sel dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasikan selama 24 jam agar sel dapat beradaptasi dan menempel di sumuran. Setelah 24 jam kemudian media diambil, dicuci dengan PBS sebanyak 100 μ L lalu ditambah 100 μ L media kultur RPMI (kontrol) maupun sampel, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media yang mengandung MTT, inkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan

berwarna ungu. Setelah 4 jam inkubasi, media yang mengandung MTT dibuang, kemudian ditambahkan 100 μ L larutan stopper SDS untuk melarutkan kristal formazan. Sel diinkubasi semalam pada suhu ruangan dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, *plate* digoyang-goyang sebentar secara horizontal, kemudian dibaca dengan *ELISA reader* pada λ 595 nm.

Pengamatan apoptosis

Sel dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam pada *cover slips* dalam *plate* 24 dan diinkubasi sampai 70% konfluen. Sel diberi perlakuan dan diinkubasi selama 15 jam. Pada akhir inkubasi, media diambil dan sel dicuci dengan PBS. *Cover slip* yang memuat sel diangkat, diletakkan diatas objek glass dan ditambah dengan 10 μ l etidium bromide-akridin oranye. Lalu sel diamati dibawah mikroskop fluoresens.

Pengamatan proliferasi sel

Sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ditransfer pada *plate* 24, masukkan seri konsentrasi sampel pada *plate* dengan replikasi sebanyak 3 kali. Lalu sel diinkubasi dalam inkubator CO₂, lama waktu inkubasi berbeda-beda mulai dari 0, 24, 48 dan 72 jam. Karena

menggunakan metode *direct counting* maka pada akhir inkubasi media diambil dan sel dicuci dengan 100 µl PBS, kemudian ditambahkan tripsin 0,25% dan didiamkan selama 3 menit. Setelah 3 menit didiamkan, tambahkan 500 µl media ke dalam masing-masing sumuran. Pindahkan kedalam eppendorf, ambil lagi sebanyak 90 µl dan ditambah 10 µl tripan blue. Letakkan pada *haemocytometer*, lalu sel diamati dibawah mikroskop inverted.

Analisis data

Analisis nilai IC₅₀

IC₅₀ merupakan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai IC₅₀ dihitung dari kurva linearitas antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel. Data persen viabilitas sel merupakan data rasio yang diperoleh dari konversi masing-masing sumuran dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ sel viabel} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{blanko}}{\text{Absorbansi kontrol} - \text{blanko}} \times 100\%$$

Adanya hubungan linear antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel dapat diketahui dari parameter linearitas, yaitu nilai koefisien korelasi (r) dengan taraf kepercayaan tertentu.

Analisis apoptosis

Sel hidup akan berfluoresensi hijau terang (dengan akridin oranye), sel yang mengalami apoptosis tahap awal akan mengalami kondensasi kromatin dan masih berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis pada tahap akhir akan terpecah-pecah menjadi bagian yang lebih kecil dan berwarna oranye (dengan etidium bromida), sedangkan sel yang nekrosis akan berwarna oranye atau merah dengan ukuran sel merah (McGahon *et al.*, 1995).

Analisis proliferasi sel

Data setelah perlakuan yang didapat dianalisis dengan menentukan persamaan garis regresi antara waktu pengamatan *versus* absorbansi. Hasil diterapkan dengan persamaan grafik antara waktu perlakuan dengan konsentrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik kuersetin terhadap sel kanker kolon WiDr

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker kolon WiDr. Sel WiDr merupakan sel epitel yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel ini ditumbuhkan pada media RPMI dengan suhu 37°C, dapat tumbuh secara kontinyu dan menempel pada *flask*. Untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup, perlu dilakukan pembiakan sel sampai didapat jumlah sel yang diinginkan. Setelah sel mencapai jumlah yang diinginkan, maka dilakukan pemanenan dan penghitungan sel.

Penghitungan sel pada saat pemanenan dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer* dan dilihat dibawah mikroskop. Sel yang sehat ditandai dengan sel berbentuk bulat, berinti, dilindungi oleh dinding sel yang jernih dan bersinar dibawah mikroskop. Sedangkan sel yang mati tampak gelap dengan inti sel yang rusak. Jumlah sel yang digunakan adalah 5×10^3 sel tiap sumuran.

Sampel kuersetin dibuat larutan stok dengan menimbang 15 mg kuersetin dilarutkan dalam 500 µL DMSO dan 500 µL aquabides sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 40000 µM. Dalam uji ini digunakan pelarut DMSO karena merupakan pelarut yang baik

untuk ion anorganik maupun senyawa organik (Fessenden and Fessenden, 1992). DMSO sendiri mempunyai sifat sitotoksik pada konsentrasi tertentu tapi pada konsentrasi rendah DMSO relatif tidak memberikan pengaruh pada pertumbuhan sel. Penggunaan DMSO sebagai pelarut dalam berbagai konsentrasi relatif tidak berpengaruh pada *cell viability* T47D (Nurulita, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini, kematian sel ataupun penghambatan pertumbuhan sel bukan akibat pengaruh DMSO melainkan karena pengaruh sampel uji yang digunakan dalam penelitian.

Sel kanker kolon WiDr ditumbuhkan pada *plate 96* sumuran dan diinkubasi selama 24 jam dengan tujuan agar sel bisa beradaptasi dan menempel pada dasar *plate*. Setelah diinkubasi selama 24 jam lalu sampel dimasukkan dengan konsentrasi yang berbeda-beda ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam supaya sampel bisa berinteraksi dengan sel kanker kolon WiDr. Setelah diinkubasi selama 24 jam, tampak fenomena kematian sel WiDr karena perlakuan sampel kuersetin dan dapat dilihat dari pengamatan perubahan morfologi. Pada pengamatan dibawah mikroskop sel

hidup tampak menempel di dasar *plate* dan berwarna terang, sedangkan sel mati terlepas dari dasar *plate* dan berwarna gelap.

Untuk memudahkan pengamatan dalam penghitungan sel yang hidup, digunakan *reagen* MTT. *Reagen* MTT merupakan garam tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Prinsip dasarnya adalah kerja enzim mitokondria pada sel aktif yang memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dalam air tapi larut dalam SDS 10 % dan berwarna ungu (Mostmann, 1983).

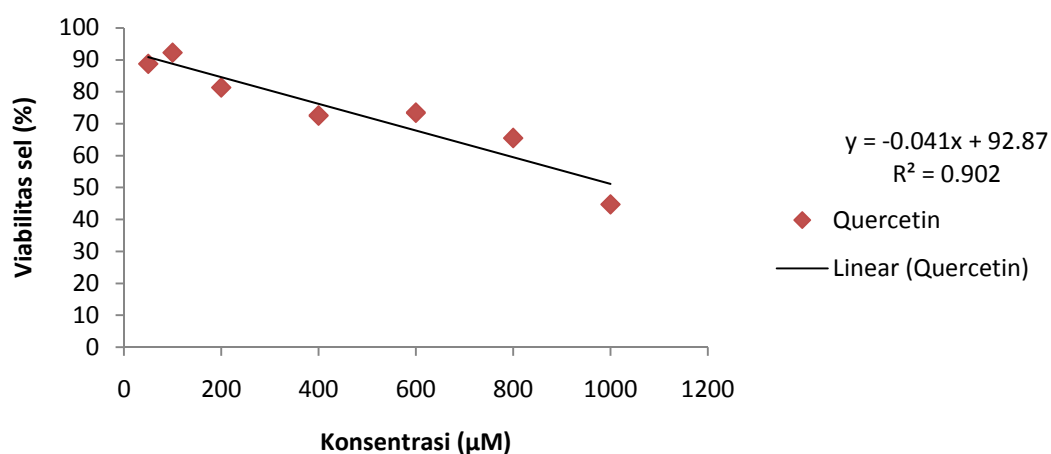
Intensitas warna ungu ini mempunyai korelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup. Sedangkan sel yang mati tidak akan terpengaruh oleh *reagen* MTT karena mitokondrianya tidak berespirasi sehingga cincin tetrazolium tidak terputus maka tidak akan terbentuk formazan yang memberikan warna ungu, tetapi warnanya tetap kuning. Setelah diinkubasi selama 4 jam dengan penambahan MTT, akan terjadi reaksi. Penghentian reaksi antara *reagen* MTT

dengan sel yang hidup yaitu dengan penambahan SDS 10 % dalam HCl 0.1 N yang dapat mendenaturasi protein menjadi unit polipeptida dan membentuk kompleks SDS polipeptida. SDS 10 % dapat melarutkan kristal formazan hasil dari reaksi MTT dan tidak menyebabkan pengendapan, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37 °C dengan tujuan untuk menyempurnakan pelarutan. SDS yang digunakan sebanyak 10 % karena kristal formazan tidak larut sempurna jika digunakan SDS kurang dari 5 % dan lebih mudah larut pada suhu 37 °C (Tada *et al.*, 1986 ; hal. 157-163).

Formazan yang terlarut kemudian diukur dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Digunakan panjang gelombang 595 nm karena pada panjang gelombang tersebut diperoleh pengukuran yang optimum sehingga akan diperoleh data yang peka dan spesifik. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, akan diperoleh absorbansi yang semakin besar pula. Hal ini menunjukkan adanya sel hidup yang bereaksi dengan garam tetrazolium, sehingga terbentuk formazan yang banyak.

Data absorbansi metode MTT yang diperoleh menunjukkan korelasi antara perlakuan dengan berbagai tingkat dosis terhadap jumlah sel yang hidup. Parameter yang digunakan untuk

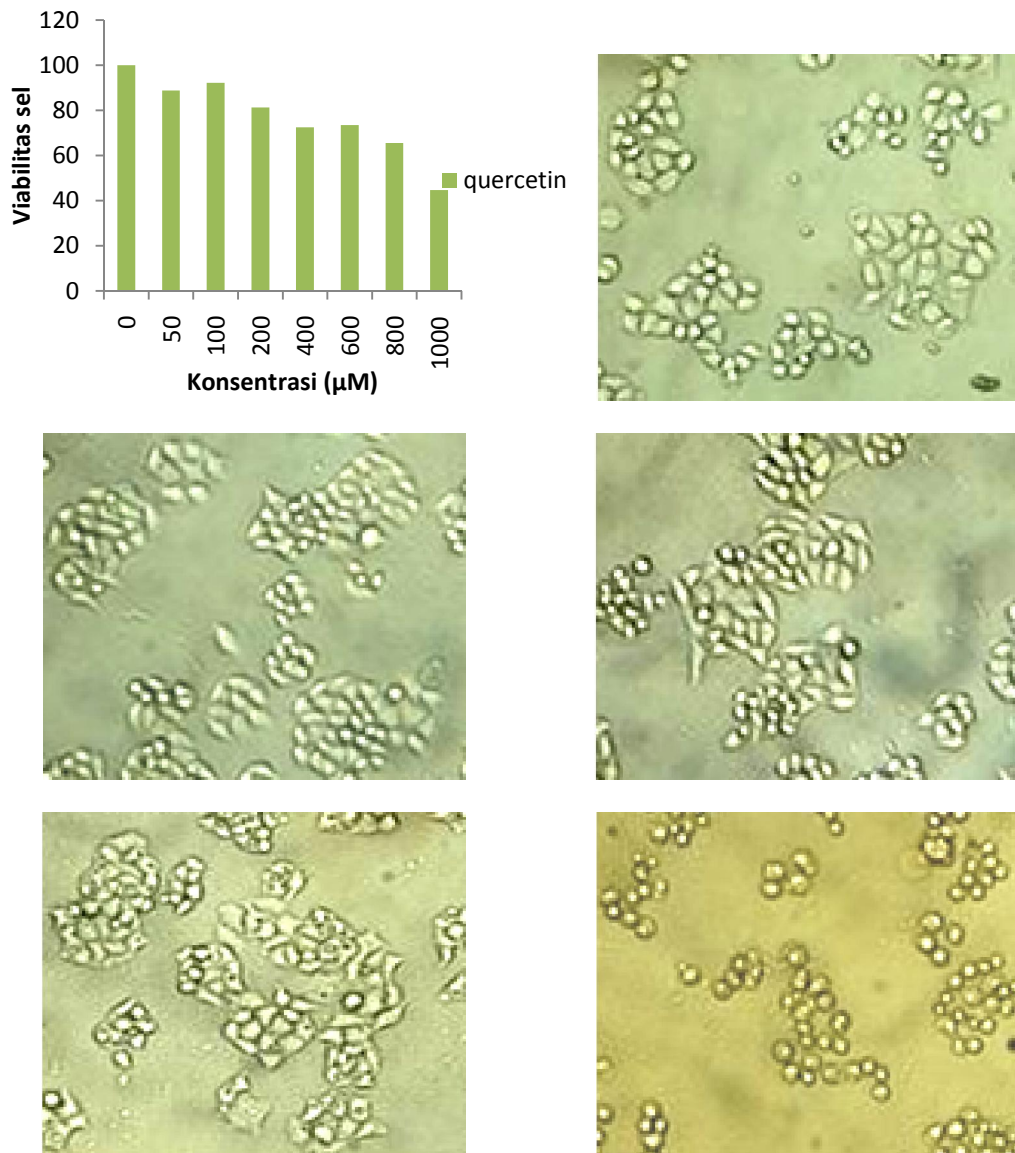
mengevaluasi potensi sitotoksik kuersetin pada penelitian ini adalah IC_{50} , yaitu dengan menghitung harga IC_{50} hasil regresi linier dari konsentrasi versus sel viabel.



Gambar 1. Grafik hubungan antara konsentrasi versus sel viabel dari sampel kuersetin. Terdapat korelasi negatif antara peningkatan konsentrasi sampel dengan prosentase kehidupan sel. Kemungkinan sel mengalami penghambatan proliferasi atau mengalami kematian

Dari grafik di atas diperoleh persamaan regresi linier $y = -0.041x + 92.87$ dengan $R = 0.949$. Dari persamaan $y = -0.041x + 92.87$ dapat dihitung nilai IC_{50} kuersetin dan dari hasil perhitungan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 1046 µM.

Berdasarkan pengamatan morfologi sel secara mikroskopis, kuersetin memberikan perubahan morfologi sel yang mengarah ke apoptosis pada konsentrasi 1000 µM (Gambar 3F).



Gambar 2. Efek perlakuan kuersetin terhadap pertumbuhan sel WiDr. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10^3 sel WiDr dengan kuersetin selama 24 jam. Grafik (A) menunjukkan efek perlakuan kuersetin terhadap sel WiDr pada kadar 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000. Belum tampak adanya perubahan morfologi sel akibat perlakuan kuersetin 50 μM (C), pada perlakuan kuersetin 100 μM (D) mulai tampak adanya perubahan morfologi sel dan pada perlakuan kuersetin 600 μM (E) dan 1000 (F) μM telah jelas terlihat adanya perubahan morfologi sel jika dibandingkan dengan kontrol (B).

Perubahan morfologi sel yang terjadi pada perlakuan kuersetin, antara lain kondensasi kromatin, fragmentasi DNA yang ditandai dengan adanya bulatan-bulatan dalam inti sel, serta *cell*

membrane blebbing akibat perubahan permeabilitas membran yang ditandai dengan bentuk membran yang berkerut-kerut.

Uji apoptosis kuersetin pada sel kanker kolon WiDr

Data sitotoksik kuersetin yang telah dijelaskan diatas menunjukkan adanya efek sitotoksik. Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya fenomena kematian sel WiDr yang disebabkan oleh perlakuan senyawa uji. Kematian sel WiDr yang disebabkan oleh perlakuan senyawa uji dikonfirmasi melalui mekanisme apoptosis. Untuk memastikan apakah kematian sel WiDr ini mengalami mekanisme apoptosis maka perlu dilakukan uji apoptosis.

Uji apoptosis dilakukan untuk mengetahui apakah kematian sel mengalami mekanisme apoptosis atau nekrosis. Jika kematian sel yang disebabkan senyawa uji melalui mekanisme nekrosis maka senyawa uji ini tidak boleh dikembangkan sebagai obat antikanker karena jika digunakan sebagai obat antikanker, senyawa ini tidak hanya akan merusak jaringan yang terkena kanker saja tapi jaringan normal disekitar jaringan yang terkena sel kanker juga akan mengalami kerusakan. Untuk mengetahui lebih jelas mekanisme kematian sel WiDr yang disebabkan karena perlakuan senyawa uji maka perlu dilakukan uji apoptosis

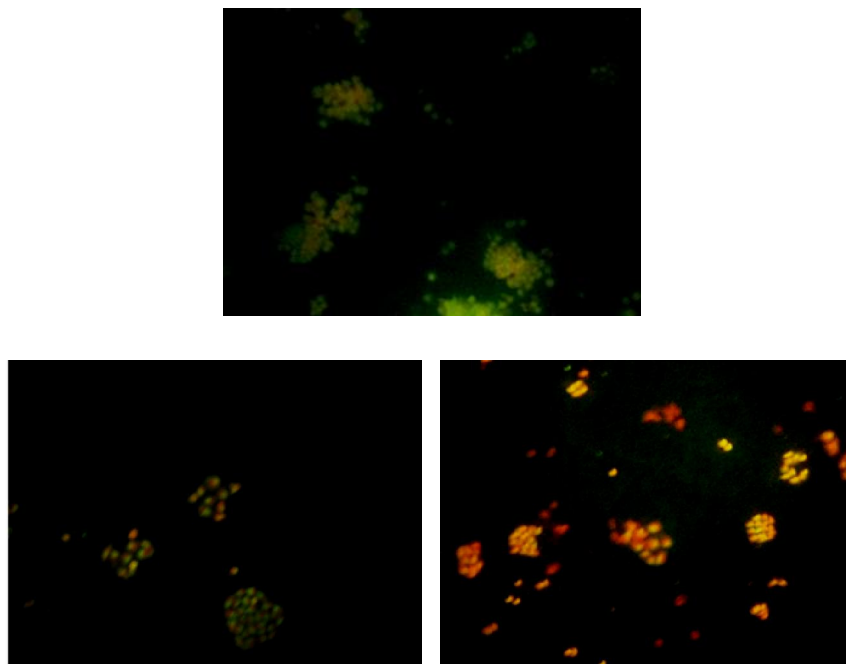
dengan menggunakan metode *doublestaining* DNA menggunakan etidium bromida-akridin oranye (EA).

Pengecatan etidium bromida atau akridin oranye secara terpisah kurang memberikan hasil yang memuaskan karena fenomena apoptosis kurang jelas. Oleh karena itu, pada uji ini digunakan *doublestaining* dengan menggunakan etidium bromida-akridin oranye untuk mempermudah pengamatan apoptosis, karena metode ini dapat menghasilkan warna yang kontras. Perlakuan *doublestaining* ini dilakukan dengan cara menanam sel dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran pada sumuran *plate* 24 yang diberi cover slip untuk memudahkan pengecatan etidium bromida-akridin oranye dan pengamatan di bawah mikroskop fluoresensi. Setelah diinkubasi 24 jam, ditambahkan 100 μ l sampel dengan konsentrasi 100 μ M dan 200 μ M. Setelah diinkubasi 24 jam, media diambil dan cover slip diangkat, kemudian diletakkan di atas objek glass untuk diberi perlakuan *doublestaining* dengan etidium bromida-akridin oranye.

Etidium bromida-akridin oranye akan mengikat DNA dengan cara berinteraksi pada DNA dan berfluoresensi dengan baik walaupun sel sudah mati tapi

DNAnya masih bisa berinteraksi dengan keduanya. Etidium bromida berfluoresensi merah yang menunjukkan sel mengalami kematian karena apoptosis, sedangkan akridin orange akan berfluoresensi hijau yang

menunjukkan bahwa sel masih hidup. Pengamatan morfologi sel yang menunjukkan bahwa sel mengalami kematian karena apoptosis dapat dilihat dibawah mikroskop fluoresensi.



Gambar 4. Efek perlakuan kuersetin dalam memacu apoptosis sel WiDr. Sel WiDr diberi perlakuan larutan uji dan dilakukan pengecatan DNA dengan pereaksi EA. Pada kontrol sel terlihat semua sel masih hidup (A). Perlakuan 100 μM sudah mulai terlihat adanya sel yang terinduksi (B) dan pada perlakuan 200 μM sudah terlihat adanya induksi apoptosis oleh kuersetin (C).

Keterangan : → = sel hidup berfluoresensi hijau, → = sel apoptosis

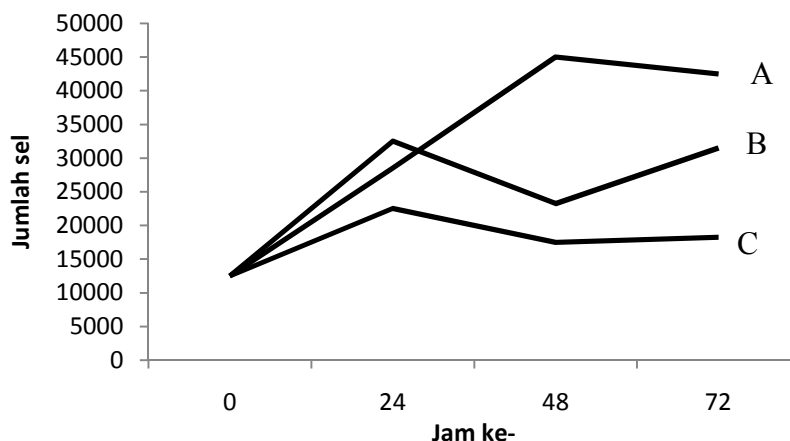
Hasil diatas menunjukkan bahwa perlakuan kuersetin 100 μM belum menunjukkan efek pemacuan apoptosis. Hal ini terlihat dari masih banyaknya sel yang berwarna hijau. Pada seri konsentrasi 200 μM baru terlihat adanya efek apoptosis yang terlihat dari sudah adanya beberapa sel yang berfluoresensi

oranye yang menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran sel. Pengamatan sampel kuersetin sebagai antikanker perlu ditelusuri lebih lanjut sampai ketinggian molekuler untuk memastikan mekanisme pemacu proses apoptosis sel melalui regulasi protein yang berperan didalamnya.

Uji kinetika proliferasi kuersetin pada sel kanker kolon WiDr

Uji ini dilakukan dengan cara mentransfer sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran pada *plate* 24. Lalu sel diinkubasi dalam inkubator CO_2 , lama waktu inkubasi berbeda-beda mulai dari 0, 24, 48 dan 72 jam. Karena menggunakan metode *direct counting* maka pada akhir inkubasi media diambil dan sel dicuci dengan 100 μl PBS, kemudian ditambahkan tripsin 0,25%

dan didiamkan selama 3 menit. Setelah 3 menit didiamkan, tambahkan 500 μl media ke dalam masing-masing sumuran. Pindahkan kedalam eppendorf, ambil lagi sebanyak 90 μl dan ditambah 10 μl tripan blue. Letakkan pada *haemocytometer*, lalu sel diamati dibawah mikroskop inverted. Untuk mengetahui efek penghambatan proliferasi dari kuersetin terhadap sel WiDr. Pengamatan dilakukan pada jam ke 0, 24, 48 dan 72.



Gambar 5. Efek perlakuan kuersetin terhadap proliferasi sel WiDr. Uji dilakukan dengan menginkubasi $1,5 \times 10^4$ sel WiDr. Pada konsentrasi 1000 μM sel mengalami penurunan saat jam ke 48. Sel mengalami penurunan pada jam ke 48 namun kembali naik pada jam ke 72 berbeda dengan kontrol perlakuan.

Keterangan : A = Kontrol, B = 800 μM , C = 1000 μM

Hasil pengamatan dari uji proliferasi sel menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1000 μM , telah terjadi penghambatan proliferasi sel akibat perlakuan kuersetin. Hal ini terlihat dari grafik yang

terbentuk, bahwa pada jam ke 48 dengan konsentrasi 1000 μM (C) grafik mengalami penurunan. Hal ini dapat menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka penghambatan

terhadap proliferasi sel juga akan semakin meningkat.

Pembahasan

Salah satu senyawa golongan flavonoid yang banyak terdapat di alam adalah kuersetin. Kuersetin dipercaya memiliki kemampuan untuk menghambat perkembangan sel kanker dengan cara menginduksi mekanisme apoptosis dan proliferasi sel. Eun Jeong Choi *et al* menjelaskan bahwa kuersetin mampu menghambat proliferasi sel MDA-MB-453 dengan konsentrasi 1-100 μM pada waktu 3, 6, 12, dan 24 jam.

Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT dengan parameter kemampuan konversi substrat MTT menjadi formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase. Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel WiDr untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan kuersetin. Uji ini dilakukan untuk menentukan kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel WiDr sampai 50% (IC_{50}). Berdasarkan uji sitotoksik diperoleh IC_{50} kuersetin sebesar 1046 μM . Pada kontrol sel dapat dilihat kondisi sel yang berbeda jika dibandingkan dengan sel yang telah

diberi perlakuan. Sel tampak berubah morfologinya mulai konsentrasi 100-1000 μM . Pada rentang konsentrasi tersebut juga terlihat bahwa kondisi sel mulai lemah dengan pemberian sampel. Selain itu pada sel dengan perlakuan kuersetin juga terlihat adanya fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis.

Salah satu target yang digunakan untuk terapi kanker adalah pada tahap proliferasi sel. Sel kanker memiliki kegagalan dalam proliferasi secara normal sehingga sel akan berproliferasi terus menerus (Yustina *et al*, 2008). Berdasarkan pengamatan kinetika proliferasi sel, baik kontrol sel maupun perlakuan kuersetin menunjukkan peningkatan jumlah sel seiring bertambahnya waktu inkubasi. Akan tetapi pada jam ke 24, 48 dan 72 secara signifikan jumlah sel pada perlakuan kuersetin lebih sedikit dibandingkan kontrol sel. Hal ini menunjukkan bahwa kuersetin mampu mengurangi kecepatan proliferasi sel secara *time dependent*. Hal ini mendasari kemungkinan mekanisme penghambatan proliferasi sel setelah adanya perlakuan sampel uji. Berdasarkan profil proliferasi sel, kuersetin mampu menghambat

pertumbuhan sel WiDr. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker bisa melalui *cell cycle arrest*, *cell cycle delay* maupun mekanisme apoptosis. Untuk mengetahui apakah mekanisme penghambatan melalui mekanisme apoptosis, maka dilakukan pengamatan apoptosis.

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode *doublestaining* menggunakan *etidium bromide-acrydine orange* (E-A). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada kontrol sel terlihat fluoresensi hijau karena hanya menyerap *Acrydine orange*. *Etidium bromide* tidak dapat masuk pada kontrol sel karena integritas sel masih baik. Pada sel dengan perlakuan kuersetin kadar 100 μM sebagian besar sel berfluoresensi hijau dan ada beberapa yang berfluoresensi oranye. Pada perlakuan kuersetin kadar 200 μM hampir semua sel berfluoresensi oranye atau merah. Hal ini menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran pada sel karena perlakuan kuersetin. Akibatnya *etidium bromide* dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluoresensi oranye atau merah sebagai indikator kematian sel.

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi kuersetin sebagai agen antikanker yang

dapat menghambat proliferasi sel dan memacu apoptosis.

KESIMPULAN

Kuersetin memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, dengan nilai IC_{50} sebesar 1046 μM . Kuersetin dapat memacu proses apoptosis pada sel kanker kolon WiDr. Kuersetin dapat menghambat proliferasi sel kanker kolon WiDr.

Daftar Pustaka

- American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures 2005* Atlanta, American Cancer Society Inc; 2005.
- American Cancer Society: *Cancer Statistics 2004* Atlanta, American Cancer Society Inc; 2004.
- American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2008-2010*. Atlanta: American Cancer Society, 2008.
- Andreas Gewies. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* page 4.
- Apantaku, L.M. 2002. Breast-conserving surgery for breast cancer. *Am. Fam. Physician* 66(12): 2271-2278.
- Cook N, Samman S: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996, 7: 66-76.

- Eun Jeong Choi, Su Mi Bae, and Woong Shick Ahn., 2008, Antiproliferative Effects of Kuersetin through Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells, *Arch Pharm Res* Vol 31, No 10, 1281-1285.
- Foster, J. S., Henley, D. C., Ahamed, S., and Wimalasena, J., 2001, Estrogen and cell cycle regulation in breast cancer, *Trend in Endocrinology and Metabolism*, 12(7): 320-327.
- Hanahan , D., and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Hawariah, A.L.P. 1998. *Memahami kanser*. Serdang: Penerbit Universiti Putra Malaysia.
- Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB: Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol kuersetin in man. *Cancer Lett* 1997, 114:139-140.
- Huber W, McDaniel L, Kaderlik K, Teitel C, Lang N, Kadlubar F: Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol 4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutation Res* 1997, 376:115-122.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd Edition, School of Biological Sciences, University of Surrey, Pearson Education, Harlow-England-London-New York, p. 150-169, 228-231, 263-264.
- Kook, D., Wolf, A. H., Yu, A. L., Neubauer, A. S., Priglinger, S. G., Kampik, A., and Welge-Lüssen, U. C., The protective effect of kuersetin against oxidative stress in the human RPE in Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 1712-1720 (2008).
- Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous Polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi- Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008;58(3):130-60.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaité, E., and Segura-Aguilar, J., Kuersetin may act a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 107-116 (1999).
- Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunological Methods*, 1983; 65: 55-63.
- Nurulita, A. N., 2005, Efek antikanker pentagamavunon-0 (PGV-0) terhadap sel kanker payudara T47D yang diinduksi 17- β -estradiol melalui mekanisme induksi apoptosis dan penghambatan angiogenesis. *Thesis*, Program Pasca Sarjana,

- Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Riedl, S.J. and Shi, Y., 2004, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, 5, 897-901.
- Sahu, S. C. and Gray, G. C., Pro-oxidant activity of flavonoids: Effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.*, 104, 193-196 (1996).
- Sellers, W.R., and Fisher, D.E., 1999, Apoptosis and cancer drug targeting, *J. Clin. Invest.*, 4 (12), 1655-1661.
- Schatzkin A, Freedman LS, Dawsey SM, Lanza E. Interpreting precursor studies: what polyp trials tell us about large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(14):1053-7.
- Tada, K, Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K., 1986, An Improved Colometric Assay for Interleukin 2, dalam *Immunological Methods*, Biotechnology Laboratories, Central Research Division, Takeda chemical industries, Ltd., Yodogawa-ku, Osaka, Japan. Hal 157-163
- Tsao, A.S., Kim, E.S., and Hong, W.K., 2004, Chemoprevention of Cancer, *CA Cancer J. Clin.*, 54, 150-180.
- Walaszek, Z., Hanausek, M., and Slaga, T.J., 2004, Mechanisms of Chemoprevention, *Suppl. Am. Coll. Phys.*, 125, 128-133.
- Wyllie, A., Donahue, V., Fischer, B., Hill, D., Keeseey, J., and Manzow, C., 2000, *Cell death apoptosis and necrosis*, Rosche Diagnostic Corporation. Hal 1-143.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL: Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001, 21:381-406.
- Yustina E.H., Ratih H.P., Y. Gilang Ikhtiarsyah, E.P. Septiyani dan Edy Meiyanto., 2008, Peningkatan aktivitas antiproliferatif Doxorubicin melalui kombinasi dengan ekstrak etanolik kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus*) terhadap sel WiDr. CCRC, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Zhang, J., Stanley, R. A., Adaim, A., Melton, L. D., and Skinner, M. A., 2006, Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 996-1005.