

Pengaruh Xanthorizol terhadap Sel Hepatoma HepG2

Tri Handayani

*Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia*

Abstract

The investigation of xanthorizol antiproliferative effect and the mechanism of cell death in human hepatoma cell line HepG2 had been investigated. Antiproliferative assay using methylene blue staining revealed that xanthorizol inhibited the proliferation of HepG2 cells with an IC_{50} value of $4.17 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$. The antiproliferative activity of xanthorizol was due to apoptosis induced in HepG2 cells and not necrosis, which was confirmed by the Tdt-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The xanthorizol-treated HepG2 cells showed typical apoptotic morphology such as DNA fragmentation. The apoptosis mediated by xanthorizol in HepG2 cells was associated with the activation of tumor suppressor p53 and down-regulation of the antiapoptotic Bcl-2 protein expression, but not Bax. The levels of Bcl-2 protein expression decreased 24-hrs after treatment with xanthorizol, and remained lower than controls throughout the experiment resulting in a shift in the Bax to Bcl-2 ratio thus favouring apoptosis. In conclusion, xanthorizol exerts antiproliferative effects on HepG2 cells via apoptosis by modulating p53 and Bcl-2 protein levels.

Keywords: *xanthorizol, antiproliferation, apoptosis, p53, Bcl-2, Bax, HepG2*

Pendahuluan

Karsinoma hepatoselular atau hepatoma merupakan kasus kanker hati yang banyak dijumpai pada kaum pria di seluruh dunia dan menyebabkan kematian ketiga setelah kanker paru-paru dan gaster.¹ Angka kematian akibat penyakit ini diramalkan akan terus meningkat karena metode pengobatan yang kurang efektif.²

Berbagai usaha telah dilakukan dalam terapi kanker hati seperti operasi, transplantasi hati, ablasi tumor, embolisasi atau kemoembolisasi arteri, dan kemoterapi. Di antara terapi tersebut, kemoterapi merupakan langkah yang paling efektif khususnya untuk terapi sel kanker yang telah mengalami metastasis.² Meskipun demikian, kemoterapi masih dianggap kurang efektif untuk terapi hepatoma³,

oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pencarian zat sitotoksik yang berpotensi untuk mengobati kanker hati. Salah satu usaha adalah menggunakan senyawa alami yang berasal dari tanaman obat yang dapat mengontrol pertumbuhan sel sehingga dapat mengurangi angka kematian penderita akibat kanker.⁴

Salah satu tanaman obat yaitu temulawak (*Curcuma xanthorriza* Roxb.), merupakan tanaman yang banyak digunakan sebagai jamu dan dipercaya dapat menyembuhkan penyakit hati.^{5,6,7} Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa ekstrak temulawak berfungsi untuk melindungi organ hati dari hepatotoksin seperti karbon tetraklorida dan asetaminofen, sehingga amat bermanfaat apabila digunakan dalam pengobatan hati.⁵ Berdasarkan penelitian *in vivo* dan *in vitro*, tanaman

ini mengandung senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai anti kanker. Senyawa aktif yang diekstrak pada temulawak tersebut adalah xantorizol, yang terbukti mempunyai potensi sitotoksik.⁸⁻¹⁴

Bahan dan Cara

Xantorizol diperoleh dari Prof. Dr. Azimahtol Hawariah Lope Pihie (Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia). Xantorizol dilarutkan dalam *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) (SIGMA Chemical Co., USA) dan dijadikan sebagai larutan stok dengan konsentrasi 5 mg/ml.

Medium *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) dan antibiotik penisilin/streptomisin dibeli dari GIBCO BRL *Life Technologies* (New York, USA).

Fetal bovine serum (FBS), diperoleh dari Mycoplex (Austria), sedangkan Triton X-100, pewarna propidium iodida (PI) dan sisplatin dibeli dari SIGMA Chemical Co., USA.

Kit *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* yang digunakan untuk *assay* TUNEL dibeli dari Promega (USA) dan antibodi p53, Bcl-2, Bax dan β -aktin diperoleh dari Pharmingen (USA). Lini sel HepG2 diperoleh dari ATCC (*American Type Culture Collection*).

Kultur Sel dan Assay Antiproliferasi

Lini sel HepG2 dikultur dalam medium DMEM yang mengandung 5% FBS dan penisilin/streptomisin dalam inkubator bersuhu 37°C dan kelembaban 5% CO₂. Medium diganti setiap dua hari sekali. *Assay* antiproliferasi¹⁵ dilakukan untuk mendapatkan nilai konsentrasi IC₅₀ dengan memperlakukan sel HepG2 menggunakan xantorizol pada konsentrasi akhir 0.2-50 μ g/ml. Sebagai kontrol negatif, sel HepG2 hanya diberi

perlakuan dengan 1% (v/v) DMSO dan sebagai kontrol positif sel HepG2 diberi perlakuan dengan senyawa antikanker cisplatin.

Pendeteksian sel apoptotik dilakukan dengan menggunakan kit *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System*. Sel HepG2 diberi perlakuan dengan 4 μ g/ml xantorizol selama 0, 24, 48 dan 72 jam. Sebagai kontrol negatif, sel HepG2 hanya diberi 1% (v/v) DMSO dan sebagai kontrol positif sel HepG2 diberi perlakuan dengan 8 μ g/ml cisplatin. Nilai Indeks Apoptotik dihitung melalui enam lapang pandang secara acak pada perbesaran 1000x.

Ekstraksi Protein dan Western Blotting

Sel HepG2 diberi perlakuan dengan 4 μ g/ml xantorizol selama 0, 24, 48 dan 72 jam. Sebagai kontrol negatif, digunakan 1% (v/v) pelarut DMSO selama 24 jam. Ekstraksi protein dilakukan menurut metode Zhou *et al.*¹⁶ dan konsentrasi protein ditentukan dengan metode Bradford.¹⁷ Selanjutnya, 20 μ g larutan stok protein dielektroforesis pada 15% SDS-gel poliakrilamida kemudian dipindahkan ke membran *Polyvinylidene difluoride* (PVDF) (Perkin Elmer). Membran dikeringkan dan direndam dalam campuran 5% susu tanpa lemak dalam larutan PBS dan 0.1% Tween-20. Selanjutnya membran diinkubasi menggunakan antibodi untuk p53, Bcl-2, dan Bax kemudian dideteksi dengan antibodi *horseradish-labeled* untuk IgG mencit. Setelah dipaparkan ke film x-ray Kodak OMAT, analisis densitometri dilakukan dengan menggunakan alat GS 670 *Imaging Densitometer* dan *Software Molecular Analyst* (BioRad, Hercules, USA). Sebagai kontrol internal digunakan antibodi β -aktin, untuk memastikan

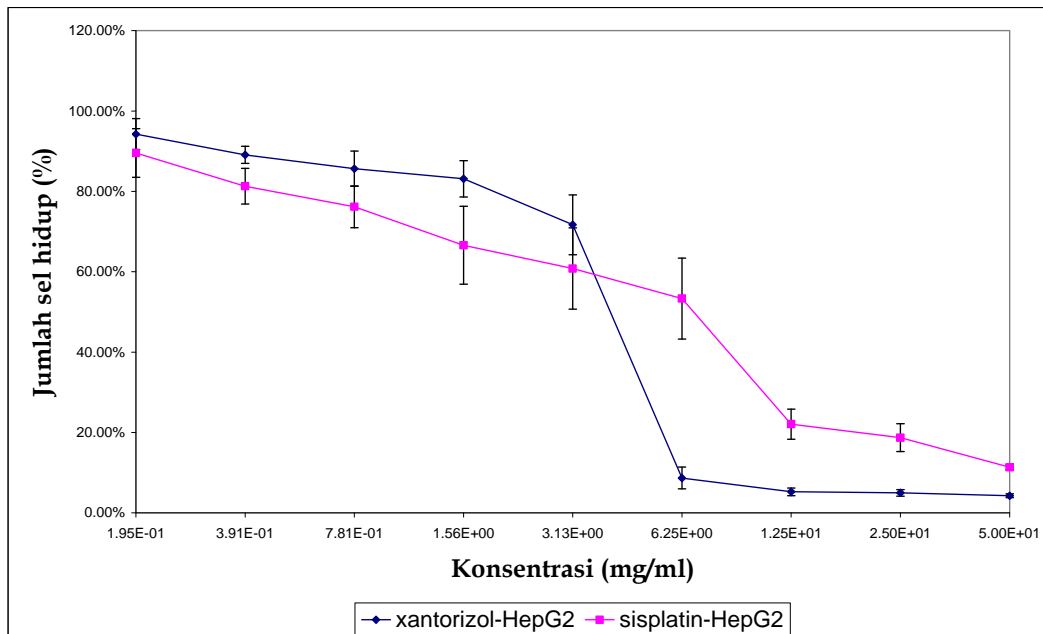
kesetaraan muatan protein dalam setiap sumur elektroforesis.

Hasil dan Pembahasan

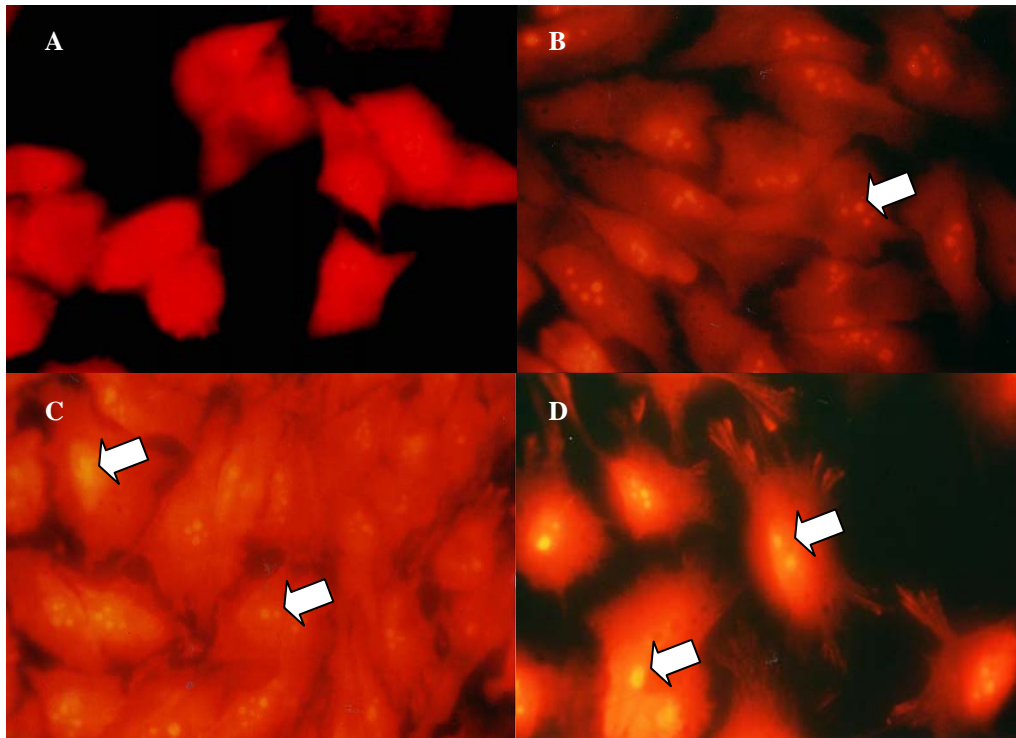
Gambar 1 menunjukkan efek antiproliferasi xantorizol dan cisplatin terhadap sel HepG2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa xantorizol mengurangi viabilitas sel HepG2 dan hasilnya bergantung pada konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi $4.17 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$, xantorizol mengurangi 50% populasi sel HepG2. Sedangkan nilai IC_{50} cisplatin terhadap sel HepG2 adalah $7.41 \pm 0.048 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan perbedaan nilai IC_{50} tersebut, xantorizol memberikan efek antiproliferasi yang

lebih tinggi terhadap sel kanker dibandingkan dengan cisplatin.

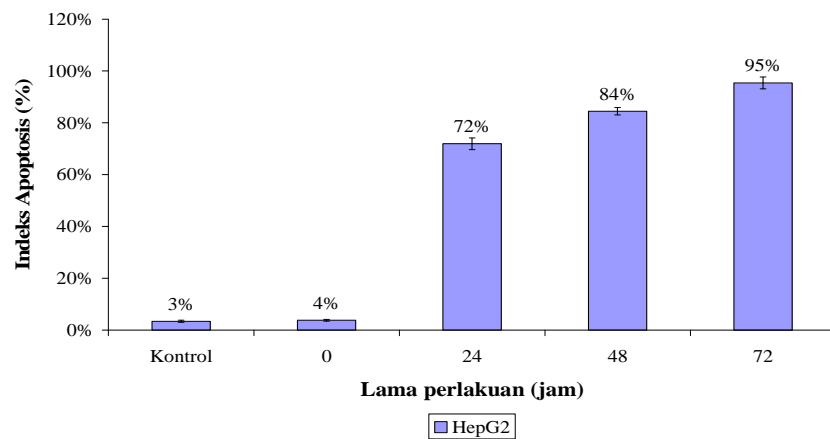
Hasil penelitian juga mendapati bahwa xantorizol mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap sel normal hati (*Chang's Liver*) dan sel normal ginjal monyet (*Vero*). Hasil penelitian tersebut sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa xantorizol bersifat toksik terhadap sel normal ginjal sapi *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK).¹³ Namun, nilai IC_{50} xantorizol terhadap sel kanker lebih rendah bila dibandingkan dengan sel normal. Hal ini membuktikan bahwa xantorizol bersifat lebih toksik terhadap sel kanker (data tidak ditunjukkan).



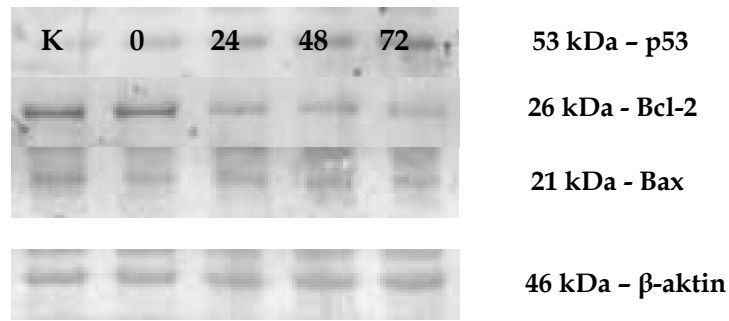
Gambar 1. Efek Antiproliferasi Xantorizol dan Cisplatin terhadap Viabilitas Sel HepG2.



Gambar 2. Hasil *assay* TUNEL terhadap Sel HepG2 yang Diberi Perlakuan Xantorizol. Tanda panah menunjukkan fluoresensi berwarna kuning sebagai indikator adanya fragmentasi DNA. A: Kontrol negatif. B: Perlakuan xantorizol selama 24 jam. C: perlakuan xantorizol selama 48 jam. D: perlakuan xantorizol selama 72 jam. Pembesaran: 1000x.



Gambar 3. Jumlah sel HepG2 yang Terapoptosis Setelah Perlakuan Xantorizol.



Gambar 4. Hasil Analisis *Western blot* terhadap Protein p53, Bcl-2, dan Bax pada Sel HepG2 Setelah Perlakuan Xantorizol.

Hasil *assay* TUNEL menunjukkan bahwa sel HepG2 yang diberi perlakuan xantorizol menampilkan ciri-ciri sel apoptotik, yaitu fragmentasi DNA, yang dibuktikan melalui fluoresensi berwarna kuning pada bagian nukleusnya (Gambar 2). Pada sel yang diberi perlakuan selama 48 jam dan 72 jam, intensitas fluoresensi semakin jelas daripada perlakuan 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa proses fragmentasi DNA lebih aktif. Pada Gambar 3 tampak bahwa jumlah sel apoptotik meningkat lebih dari 70% setelah perlakuan selama 24 jam, dibandingkan dengan kontrol yang kurang dari 5%.

Gambar 4 menunjukkan hasil *Western blotting* terhadap protein p53, Bcl-2 dan Bax pada sel HepG2 setelah perlakuan xantorizol. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan xantorizol pada sel HepG2 menyebabkan peningkatan ekspresi protein p53, penurunan ekspresi protein Bcl-2, sedangkan ekspresi protein Bax tidak terpengaruh. Ekspresi protein β -aktin yang digunakan sebagai kontrol internal juga tidak berubah, yang menunjukkan kesamaan muatan atau kepekatan

protein di dalam setiap sumur elektroforesis.

Pertumbuhan tumor dapat dihambat dengan mengaktifkan faktor-faktor apoptosis di dalam sel seperti protein penekan tumor p53.¹⁸⁻²¹ Protein ini diaktifkan apabila terdapat senyawa perusak DNA seperti radiasi atau obat kemoterapi.^{22,23,24} Protein p53 yang telah diaktifkan berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengaktifkan gen-gen yang mengontrol siklus sel dan apoptosis.²²⁻²⁶ Salah satu protein target bagi p53 adalah protein anti-apoptosis Bcl-2.²⁷ Protein p53 berfungsi menurunkan tingkat ekspresi protein Bcl-2 selama proses apoptosis.^{27,28}

Penurunan tingkat ekspresi protein Bcl-2 yang tidak disertai dengan perubahan ekspresi protein Bax di dalam sel HepG2 setelah perlakuan xantorizol menyebabkan rasio protein Bax/Bcl-2 meningkat. Hal ini menginduksi pembentukan homodimer Bax/Bax pada membran luar mitokondria.²⁷ Selanjutnya, homodimer tersebut akan membentuk saluran ion pada membran mitokondria yang akan melepaskan sitokrom *c* ke sitoplasma.²⁹ Sitokrom *c* yang telah dilepaskan akan berinteraksi dengan Apaf-1 untuk

mengaktifkan kaskade kaspase dan menginduksi apoptosis.^{30,31} Penurunan tingkat ekspresi protein Bcl-2 juga akan menyebabkan ion kalsium dilepaskan dari lumen retikulum endoplasma (ER) ke dalam sitoplasma^{21,32}, sehingga mengaktifkan berbagai faktor apoptotik seperti kalsineurin, fosfolipase dan protease.²⁹ Hal ini didukung oleh penelitian Kim *et al.*¹¹ bahwa xantorizol meningkatkan konsentrasi ion kalsium di dalam sitoplasma sel kanker skuamosa mulut SCC-15. Sebagai tambahan, penurunan tingkat ekspresi protein Bcl-2 akan menghambat ekspresi protein kinase Raf-1 dan ERK sehingga menyebabkan apoptosis.³³ Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Choi *et al.*⁹ yang membuktikan bahwa xantorizol mencegah metastasis tumor paru-paru pada mencit galur C57BL6 dengan menurunkan tingkat ekspresi protein Raf-1 dan ERK setelah perlakuan selama 2 minggu.

Simpulan

Simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini, adalah bahwa xantorizol mempunyai efek anti-proliferatif terhadap lini sel HepG2, mengurangi viabilitas sel HepG2 yang bergantung kepada konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi $4.17 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$, xantorizol mengurangi 50% populasi sel HepG2. Xantorizol juga menginduksi kematian sel secara apoptosis pada sel HepG2 dan peningkatan jumlah sel apoptotik sebanding dengan waktu pemaparan xantorizol. Xantorizol menyebabkan apoptosis pada sel HepG2 dengan mengaktifkan protein p53 dan penurunan tingkat protein Bcl-2.

Daftar Pustaka

1. Parkin MD, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistic, 2002. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2005; 55: 74-108.
2. Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of*
3. Goldstein LJ. Clinical reversal of drug resistance. *Current problems in Cancer*. 1995; 19(2): 65-124.
4. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharm*. 1997; 53: 121-133.
5. Lin SC. Protective and therapeutic effects of *Curcuma xanthorrhiza* on hepatotoxin-induced liver damage. *Am J Chinese Med*. 1995; 23(3-4): 243-254.
6. Yamazaki M. Studies on pharmacologically active principles from Indonesian crude drugs. I. Principle prolonging pentobarbital-induced sleeping time from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Chem Pharm Bulletin*. 1988; 36(6): 2070-2074.
7. Yasni S, Imaizumi K, Sugano M. Effects of an Indonesian medicinal plant, *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., on the levels of serum glucose and triglyceride, fatty acid desaturation, and bile acid excretion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Agricultural Biol Chem* 1991; 55 (12): 3005-3010.
8. Anisah J, Azimahtol Hawariah LP. Aktiviti anti-kanker xanthorrhizol ke atas titisan sel melanoma manusia, HM3KO dan mod kematiannya. *Prosiding Kolokium Siswazah Kelima*. Universiti Kebangsaan Malaysia. 2005.
9. Choi MA, Kim SH, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in experimental mouse lung metastasis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 326: 210-217.
10. Itokawa H, Hirayama F, Funakashi K, Takeya K. Studies on the antitumor Bisabalone sesquiterpenoids isolated from *Curcuma xanthorrhiza*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1985; 33(8): 3488-3492.
11. Kim JY, Lee SH, Chung WY, Park KK, Lee SH, Seo JT. Xanthorrhizol induces

- cell death in oral squamous carcinoma cells.
<http://kacp.or.kr/journal/haksul/20031213.poster.pdf> accessed on Januari 8, 2005.
12. Lee CK, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Effect of curcumin, xanthorrhizol and tamoxifen on Wnt signaling pathway components in human breast cancer cells. <http://kacp.or.kr/journal/haksul/20031213.poster.pdf> accessed on Januari 8, 2005.
 13. Norzila I, Azimahtol Hawariah LP, Meenakshi N. Xanthorrhizol induces apoptosis via the up-regulation of bax and p53 in HeLa cells. *Anticancer Research*. 2005; 25(3B): 2221-2227.
 14. Siti Farah M, Halimah AS, Azimahtol Hawariah LP. Potensi xanthorrhizol sebagai agen antitumor kulit. *Prosiding Kolokium Siswazah Kelima*. Universiti Kebangsaan Malaysia, 2005.
 15. Lin L, Hwang PL. Antiproliferative effects of oxygenated sterols: positive correlation with binding affinities for the antiestrogen binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991; 1082: 177-184.
 16. Zhou JM, Zhu XF, Pan QC, Liao DF, Li ZM, Liu ZC. Manumycin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2003; 12: 955-959.
 17. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
 18. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3): 485-495.
 19. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*. 1997; 6: 133-142.
 20. Kauffman SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental of Cell Research* 2000; 256: 42-49.
 21. Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. *Journal of National Cancer Institute*. 1997; 89(14): 988-990.
 22. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 1993; 74: 957-967.
 23. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins: Pathologic basis of disease*. 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999.
 24. Hansen R, Oren M. p53: from inductive signal to cellular effect. *Current Opinion Genetic Development*. 1997; 7: 46-51.
 25. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis-the p53 network. *J. Cell Sci*. 2003; 116: 4077-4085.
 26. Macdonald F, Ford CHJ. *Molecular biology of cancer*. Oxford: BIOS Scientific Publisher Ltd. 1997
 27. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*. 1994; 9: 1799-1805.
 28. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce, S.M. Downregulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1994; 54: 2095-2097.
 29. Orrenius S, Zhitovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *National Rev of Mol and Cellular Biol*. 2003; 4: 552-565.
 30. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001; 26: 61-66.
 31. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann Rev of Cell & Develop Biol*. 1999; 15: 269-290.
 32. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoprotein. *Oncogene*. 1998; 16: 2265-2282.
 33. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*. 1996; 87: 629-638.

