

APLIKASI KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L.) DALAM UPAYA PREVENSI KERUSAKAN DNA AKIBAT PAPARAN ZAT POTENSIAL KARSINOGENIK MELALUI MNPCE ASSAY

Raisatun Nisa Sugiyanto⁽¹⁾, Shofy Rahmadani Putri⁽²⁾, Ferina Septiani Damanik⁽³⁾, Gusti Made Aryandana Sasmita⁽⁴⁾

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Email: ¹raisatunnisa@gmail.com; ²shofy_putri@yahoo.com; ³ferinadamanik@gmail.com; ⁴aryandanasasmita@gmail.com

Abstract

Genotoxic effect is related to the mutation of the gene in the DNA. *Caesalpinia sappan* L. is one of *Caesalpiniaceae* family found in Indonesia containing brazilin and brazilein. It has been reported to have antioxidant activity and could potentially be used in the prevention of DNA damage. The aim of this study is to know the activity of *Caesalpinia sappan* L. ethanolic extract (CEE) as antigenotoxic agent. *Caesalpinia sappan* L. heartwood was macerated with 70% ethanol. The antigenotoxic activity was observed by micronucleus assay in vivo modeled by cyclophosphamide-induced female Swiss mice. CEE treatment was done with the dosage of 250, 500, and 1000 mg/kgBW. Mice peripheral blood was taken in the end of the study and observed for the number of mononuclear polychromatic erythrocyte (MNPCE) by Giemsa staining. Molecular docking was done to evaluate the affinity of brazilin, brazilein, and cyclophosphamide to CYP 3A4 enzyme. Based on the study, CEE has antigenotoxic activity showed by the number of MNPCE which is reduced significantly compared to cyclophosphamide control group. The mechanism of antigenotoxic activity is probably because of the inhibition of cyclophosphamide binding to CYP 3A4 enzyme by brazilin and brazilein, as the affinity to CYP 3A4 of brazilin and brazilein were higher than cyclophosphamide.

Keyword: Antigenotoxic, MNPCE Assay, *Caesalpinia sappan* L.

1. PENDAHULUAN

Meningkatnya prevalensi penyakit degenerative dan kanker dalam dekade terakhir ini berkaitan dengan tingginya tingkat paparan zat-zat berbahaya dan potensial karsinogenik. Paparan makanan, obat-obatan, kosmetika, polusi udara, radiasi sinar ultraviolet sering kali memiliki efek genotoksik. Genotoksik didefinisikan sebagai sifat senyawa yang dapat menyebabkan ketidakstabilan genetic hingga kerusakan pada DNA sehingga dapat merubah sistem biologis dan fungsional tubuh. Senyawa genotoksik ini menyebabkan perubahan biosintesis protein dan metabolisme DNA, perubahan struktur kromosom, kesalahan perbaikan DNA atau selama replikasi DNA, sehingga mengarah pada berbagai penyakit,

termasuk kanker (Siswandono *et al.*, 2000). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi efek genotoksik ini adalah melalui pengembangan senyawa yang dapat bermanfaat sebagai antigenotoksik dan kemopreventif.

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan tanaman famili *Caesalpiniaceae* yang banyak ditemui di Indonesia. Kayu secang secara empiris diketahui memiliki banyak khasiat penyembuhan dan sering dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman kesehatan. Kayu secang memiliki kandungan senyawa berupa brazilin (C₁₆H₁₄O₅), sappanin (C₁₂H₁₂O₄), brazilein, dan minyak atsiri seperti D- α -felandrena, asam galat, osinema, dan damar. Berdasarkan hasil penelitian Lim *et al.*, (1997), kayu secang memiliki daya antioksidan yang andal dengan indeks antioksidatif ekstrak air kayu secang lebih tinggi daripada antioksidan

komersial (BHT dan BHA) sehingga potensial sebagai agen penangkal radikal bebas. Penelitian yang dilakukan oleh Rahmi, *et al.* (2010) menyebutkan bahwa, ekstrak etanolik kayu secang memiliki aktivitas antikanker dengan menurunkan viabilitas pada beberapa sel kanker payudara MCF-7, T47D, kanker kolon WiDr, kanker serviks HeLa namun tetap selektif terhadap sel normal Vero. Meninjau besarnya potensi kayu secang, dalam penelitian ini diteliti efek Ekstrak Etanolik Kayu Secang (EKS) terhadap potensi antigenotoksisitas berdasarkan metode MNPCE Assay.

2. METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2013. Tempat penelitian adalah Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Farmasi UGM.

Bahan Penelitian

Serbuk kayu secang diperoleh dari BPTOOOT Tawangmangu sebanyak 2 kg dan telah dideterminasi di laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi. aquadest (Asia Lab), Phosphate Buffer saline (PBS) (*Sigma*), NaCl fisiologis (Aldrich), Pewarna Giemsa (Aldrich), Xylol (Aldrich), entellan (Aldrich), etanol 70%. Bahan untuk *molecular docking* adalah senyawa brazilin dan brazilein yang dibuat strukturnya dengan menggunakan software Marvin Sketch. Sedangkan set struktur kompleks protein yang didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB) di-download dari situs <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Subjek Uji

Mencit betina galur Swiss yang berusia 6-7 minggu dengan berat badan 6-7 minggu dengan berat badan 22,5-27,5 g sebanyak 42 ekor. Setiap kelompok mencit ditempatkan dalam kandang plastik yang berbeda dengan alas sekam, dengan suhu ruangan 23-25°C, kelembaban 70 -80%. Saat perlakuan semua mencit diberi makan berupa pelet dan minuman dari air ledeng masing-masing secara ad-libitum.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa alat bedah, kandang tikus, sarung tangan, masker, kertas saring, kapas, *staining jars*, spuit injeksi oral 1 mL (*Terumo, Japan*), blender, corong kaca, labu erlenmeyer, *Rotary Evaporator*, *waterbath*, cawan porselin, vortex, mortir dan stamper, labu takar, pipet tetes, timbangan analitik (*Chyo Jupiter C3, 100MD*), neraca elektrik (*Shimazu, type LS-6DT*), mikroskop binokuler (*Olimpus, Japan*), microscope slide, kamera digital, dan alat-alat gelas yang lazim. Alat yang dibutuhkan dalam PC, *software PLANTS 1.1 manual*, Co-Pendrive linux-KDE, YASARA dan MarvinSketch.

Pelaksanaan

Pembuatan Ekstrak Kayu Secang (EKS)

Serbuk kayu secang diperoleh dari BPTOOOT Tawangmangu sebanyak 2 kg dan telah dideterminasi di laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi. Serbuk dimaserasi dengan penyari etanol 70% selama 5 hari. Fraksi etanol yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vaccum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Uji Molecular Docking

Uji molecular docking dilakukan untuk mengetahui interaksi senyawa kandungan secang yaitu brazilin dan brazilein terhadap protein CYP3A4. Senyawa brazilin dan brazilein yang dibuat strukturnya dengan menggunakan software Marvin Sketch. Sedangkan set struktur kompleks protein yang didapatkan dari Protein Data Bank (PDB) di-download dari situs <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do> dengan kode 1tqn. Analisis dilakukan untuk memperoleh nilai ΔG sebagai score docking. Nilai ΔG menunjukkan kekuatan ikatan antara ligan dan reseptor. Semakin rendah harga ΔG , maka ikatannya semakin kuat dan stabil.

Uji MNPCE Assay In Vivo

Hewan uji kemudian dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit. Kelompok perlakuan terdiri dari kontrol negatif tanpa perlakuan, kontrol ekstrak (EKS 1000mg/kgBB), kontrol positif siklofosamid (SIF 50 mg/kgBB), kontrol

pelarut CMC-Na, kelompok perlakuan EKS 250 mg/kgBB + SIF 50 mg/kgBB, kelompok perlakuan EKS 500 mg/kgBB + SIF 50 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan EKS 1000 mg/kgBB + SIF 50 mg/kgBB. Perlakuan EKS diberikan secara per oral selama 7 hari, sedangkan SIF diberikan secara i.p pada 2 hari terakhir.

Seluruh kelompok perlakuan dilakukan sampling darah perifer melalui vena ekor pada hari ke-7 perlakuan, yaitu saat 6 jam setelah pemberian SIF. Sampel darah kemudian dibuat preparat apus darah perifer pada *microscope slides*, kemudian difiksasi methanol selama 15 menit dan dilanjutkan dengan pengecatan Giemsa 10% dalam PBS pH 6.8 dengan waktu inkubasi 1 jam.

Preparat apus darah kemudian dianalisis dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x untuk dihitung jumlah MNPCE pada tiap 1000 sel PCE. Untuk menghindari kesalahan negatif dan mengukur tingkat ketoksikan senyawa yang dipaparkan, dihitung pula rasio PCE/NCE dalam 5 bidang pandang mikroskop. Analisis statistika digunakan SPSS dengan uji *one way* Anova yang dilanjutkan *Post Hoc Tukey Test* untuk mengetahui signifikansi perbedaan hasil antar tiap kelompok perlakuan ($P < 0.05$)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

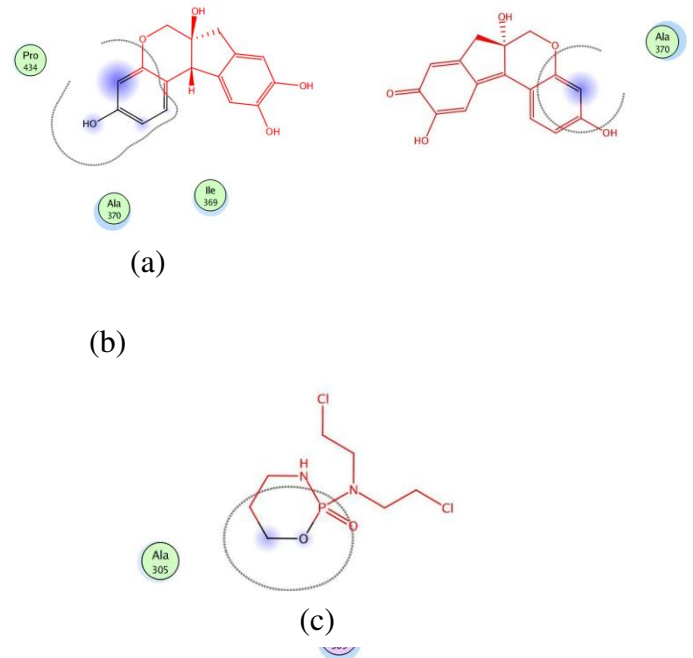
Molecular Docking Brazilin dan Brazilein terhadap Protein CYP 3A4

Tabel 1. Data score docking

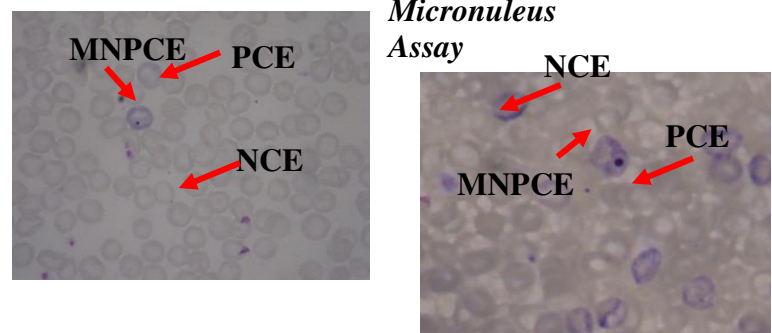
	PROTEIN CYP 3A4
RMSD	0.6766°A
Brazilin	-67.4562
Brazilein	-77.9577
Cyclophosphamide	-62.8616

Protein oksidase yang menjadi target adalah CYP 3A4 dari *protein data bank* dengan kode protein 1tqn. Hasil data *score docking* yang didapat ditampilkan dalam Tabel 1. Dari hasil docking didapatkan *score docking* brazilein dan brazilin lebih besar dari pada score docking siklofosfamid. Hal ini menandakan afinitas ikatan antara protein oksidase CYP 3A4 terhadap brazilein dan brazilin lebih besar daripada siklofosfamid, sehingga dapat

menyumbang mekanisme inhibisi metabolisme siklofosfamid.



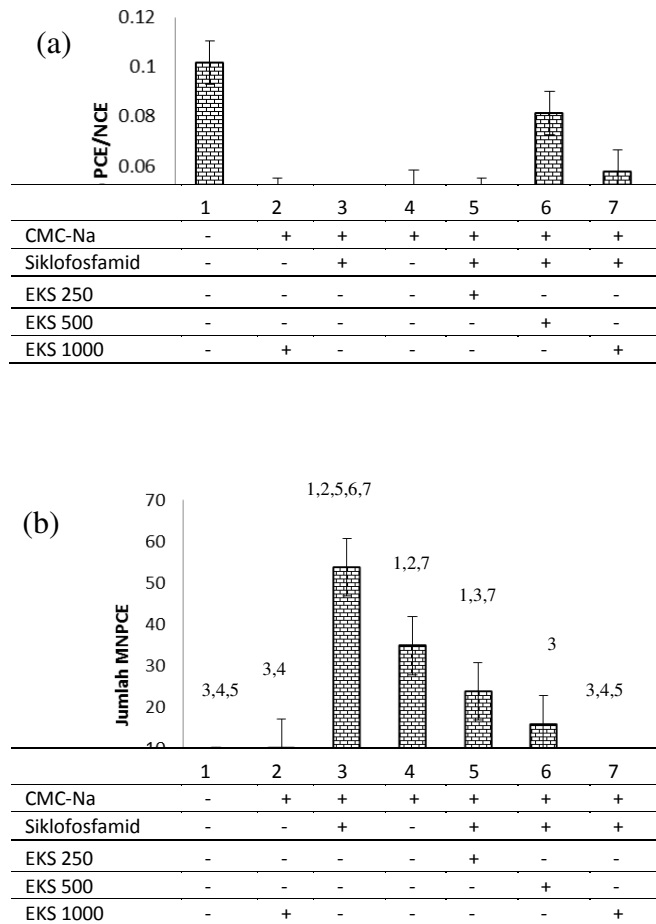
Gambar 2. Visualisasi ikatan asam amino yang terbentuk antara protein CYP 3A4 dengan brazilein (a), brazilin (b), dan siklofosfamid (c).



Gambar 3. Preparat apus darah perifer diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x

Dari hasil analisis yang telah dilakukan terdapat penurunan jumlah MNPCE yang signifikan antara kelompok perlakuan kontrol siklofosfamid dengan kelompok perlakuan ekstrak dosis 500 mg/kgBB dan 1000mg/kgBB

yang telah di induksi siklofosfamid. Hal ini menyatakan bahwa ekstrak dosis tinggi dapat memberikan efek antigenotoksis dalam penelitian ini, sedangkan pada dosis rendah yakni 250 mg/kgBB EKS belum dapat menunjukkan efek antigenotoksis.



Gambar 4. Grafik perbandingan rasio jumlah PCE/NCE (a) dan perbandingan jumlah MNPCE (b) antar kelompok perlakuan dalam penelitian

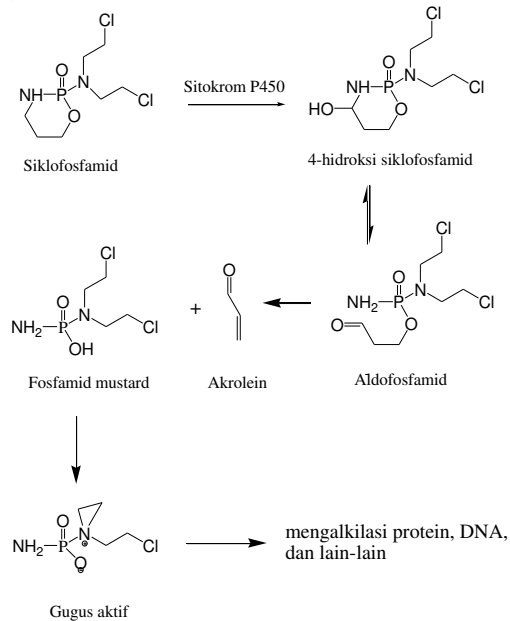
Rasio PCE/NCE menunjukkan ketoksikan dari paparan senyawa yang diberikan. Semakin kecil rasio maka semakin toksis sifat senyawa bagi tubuh hewan uji. Siklofosfamid menurunkan rasio PCE/NCE sedangkan perlakuan EKS mampu memperbaiki profil rasio PCE/NCE. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa EKS tidak bersifat toksis pada DNA dilihat dari peningkatan rasio PCE/NCE setelah perlakuan senyawa siklofosfamid.

Ketidakstabilan genetik akibat senyawa genotoksis merupakan fenomena yang biasa memeperantarai timbulnya berbagai penyakit, salah satunya adalah kanker. Salah satu senyawa yang terbukti bersifat genotoksis adalah siklofosfamid. Siklofosfamid (SIF) merupakan agen sitotoksik pengalkil yang sering digunakan sebagai agen antineoplastik pada treatment beberapa tumor seperti sarkoma dan karsinoma paru-paru dan kelenjar mammae (Withrow, et al, 2001). Efek sitotoksik dari SIF secara langsung berhubungan dengan radikal bebas yang dihasilkan dari proses metabolisme. SIF dimetabolisme secara cepat oleh hati menggunakan enzim sitokrom P-450 dan menghasilkan metabolit aktif teralkilasi seperti 4-hidroksisiklofosfamid, aldofosfamid, dan akrolein yang mengganggu sintesis sel DNA dan menginduksi kerusakan DNA untai tunggal (Crook, et al., 1986) yang dapat mengakibatkan terbentuknya mikronukleus dan kematian sel (Bryce, et al., 2010; Tripathi, et al., 2009). Akrolein juga dapat menghasilkan stress oksidatif yang mengakibatkan berkurangnya aktivitas enzim antioksidan dan dapat meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi ROS intraseluler seperti radikal anion superoksida, radikal hidroksil, dan oksigen singlet.

Kayu secang merupakan tanaman yang biasa dimanfaatkan oleh masyarakat untuk diolah menjadi minum kesehatan, misalnya di daerah Yogyakarta campuran kayu secang digunakan dalam *wedang uwuh*. Kandungan utama kayu secang merupakan senyawa brazilin dan brazilein. Berdasarkan aktivitas antioksidannya, brazilin mempunyai efek melindungi tubuh dari keracunan akibat radikal kimia sedangkan brazilein diketahui memiliki aktivitas antikanker dengan menghambat protein inhibitor apoptosis survivin dan terlibat dalam aktivasi caspase 3 dan caspase 9 (Zhong et al., 2009).

Dalam mencegah proses mutagenesis dan karsinogenesis secara teoritis dapat dilakukan melalui penghambatan pada fase promosi sampai fase progresi mutagenesis. Proses inisiasi dapat dihambat oleh senyawa yang menurunkan aktivasi metabolisme senyawa karsinogen, meningkatkan detoksifikasi senyawa karsinogen, atau mencegah terjadinya ikatan antara

karsinogen dengan target seluler (Ruddon, 2007).



Gambar 5. Mekanisme kerusakan DNA oleh senyawa siklofosfamid

Dari hasil molecular docking yang dilakukan dalam penelitian ini, terbukti bahwa kandungan EKS yakni brazilin dan brazilein memiliki afinitas yang lebih kuat terhadap enzim pemetabolisme siklofosfamid yaitu CYP 3A4 secara *in silico* dibandingkan dengan afinitas ikatan siklofosfamid dengan CYP 3A4. Protein CYP 3A4 merupakan enzim yang berperan dalam pemetabolisme berbagai agen antikanker, salah satunya siklofosfamid, menjadi metabolit toksisnya yang berperan dalam efek genotoksik (Guengerich, 1997). Simulasi *molecular docking* adalah metode komputasi yang digunakan untuk memprediksi afinitas suatu ligan terhadap suatu protein, maka didapatkan prediksi bahwa brazilin dan brazilein sebagai senyawa utama yang terkandung dalam EKS dapat mencegah sifat toksik dari siklofosfamid dengan menghambat metabolisme oleh enzim CYP 3A4 menjadi metabolit toksisnya. Selain itu dilakukan pula visualisasi ikatan yang terbentuk antara ligan dengan asam amino dari proteinnya. Dalam penelitian ini interaksi yang terjadi didominasi oleh interaksi solven dengan daerah ikatan ligan disekitar gugus polar dari senyawa tersebut.

Selain memprediksi potensi berdasarkan *in silico*, dalam penelitian ini juga dilakukan micronucleus assay. Salah satu indikator terjadinya mutasi genetik akibat paparan senyawa genotoksik adalah terbentuknya mikronukleus pada proses hematopoiesis. Secara teoritis mikronukleus merupakan kromatin sitoplasmik yang tampak sebagai inti kecil terbentuk dari patahan kromosom yang diasingkan dari inti (nukleus) pada tahap anaphase pembelahan sel. Setelah mencapai tahap telofase, elemen sentris menjadi inti sel anak, sedang fragmen kromosom yang tertinggal tetap berada pada sitoplasma membentuk inti kecil yang disebut mikronukleus. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) menunjukkan tingkat kerusakan genetik dalam sistem *eritropoietik* suatu makhluk hidup (Didi J.P. *et al.*, 2000).

Dari penelitian ini terbukti bahwa EKS dengan dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB dapat memberikan efek antigenotoksik dengan menurunkan jumlah MNPCE tiap 1000 PCE yang ada dibandingkan dengan kelompok kontrol siklofosfamid. EKS juga tidak bersifat toksik ditunjukkan dengan perbaikan profil rasio PCE/NCE yang meningkat setelah perlakuan senyawa toksik siklofosfamid. Hal ini memberikan penelitian awal yang sangat sebagai agen antigenotoksik untuk dapat dikembangkan lebih lanjut.

4. KESIMPULAN

EKS dapat memberikan efek antigenotoksik terhadap paparan senyawa mutagen siklofosfamid berdasarkan mikronukleus Assay. Sifat antigenotoksik ditunjukkan oleh kemampuan EKS pada dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB dapat menurunkan jumlah MNPCE secara signifikan terhadap kelompok kontrol siklofosfamid, dan dapat meningkatkan rasio PCE/NCE yang berarti senyawa EKS tidak toksik. Sedangkan dari hasil uji *in silico* dengan molecular docking, sifat antigenotoksik EKS diprediksi melalui penghambatan ikatan antara siklofosfamid dengan enzim pemetabolisme CYP 3A4 oleh ikatan dengan brazilin dan brazilein yang merupakan kandungan utama EKS.

5. REFERENSI

- Bryce, S.M., Shi, J., Nicolette, J., Diehl, M., Sonders, P., Avlasevich, S., Raja, S., Bemis, J.C., Dertinger, S.D.: High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2010; 51: 260–266.
- Crook, T.R., Souhami, R.L., McLean, A.E.: Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Res.*, 1986; 46: 5029–5034
- Didi J.P., Anas Subarnas, Cucu Hadiansyah, dan Supriyatna.(2000). Aktivitas Antimutagenik dan Antioksidan Daun Puspa (*Schima wallichii* Kort). *Cermin Dunia Kedokteran*. No.127.
- Guengerich FP (1997) Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions, in: *Drug- Drug Interactions: Scientific and Regulatory Perspectives* (Li AP ed), pp 7–35, Academic Press, San Diego.
- Lim, D.K., U. Choi, and D.H. Shin, 1997, Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* Linn., *Korean J. Food Sci. Technol*, 28(1): 77–82
- Tripathi, D.N., Jena, G.B.: Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. *Chem. Biol. Interact.*, 2009; 180: 398–406.
- Rahmi K, Erlina Rivanti, Ika Nurziah. 2010. Kajian Komprehensif Ekstrak Etanolik Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) sebagai Agen Kemopreventif Tertarget. Naskah Tidak Terpublikasi.
- Ruddon, R.W. (2007). *Cancer Biology*. Edisi Keempat. New York: Oxford University Press Inc. Halaman 62, 82, 92, 493.
- Siswandono, Soekardjo, B., 2000, *Kimia Medisinal*, Edisi 2, Airlangga University, Surabaya
- Withrow, S.J., et al. 2001. *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd Edn. W.B. Saunders, Philadelphia. USA
- Zhong X, Wu B, Pan YJ, Zheng S. 2009. Brazilein inhibits survivin protein and mRNA expression and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Neoplasma*. 56(5):387-92.