

ANTIANGIOGENIC EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF GREEN ALGAE (*Spirogyra sp.*) AGAINST EXPRESSION COX-2 IN T47D CELLS

EFEK ANTIANGIOGENESI EKSTRAK ETANOL GANGGANG HIJAU (*Spirogyra sp.*) BERDASARKAN EKSPRESI COX-2 PADA SEL T47D

Wahyu Widyaningsih*, Nina Salamah, Hari Susanti, Dwi Fitriani
Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases that arise when a cell or group of cells that regulate out of control growth. Green algae (*Spirogyra sp.*) is one of the medicinal plants used in traditional medicine for the treatment of cancer. Green algae (*Spirogyra sp.*) has active substances such as melatonin. Melatonin which is a compound that has been examined by researchers world as anticancer drugs and antioxidants. This study aims to determine the effect of ethanol extract of green algae (*Spirogyra sp.*) on the expression of COX - 2 in T47D cells. Green algae was extracted using a Soxhlet apparatus with 96 % ethanol. This study used three groups: control cells , ethanol extract of green algae concentrations 247.668 ug / mL and 123.834 mg / mL. To ensure the expression of caspase-3 and Bcl-2, test was conducted using indirect immunocytochemistry. Observations were carried out using a light microscope to see and count the percent expression of COX - 2. The results obtained showed significant difference, decreased expression of COX - 2 in each group. It can be concluded that the ethanol extract of green algae (*Spirogyra sp.*) decreased COX - 2 expression in T47D cells. Key words : Green algae, *Spirogyra sp.*, COX-2, T47D cells, immunocytochemistry.

ABSTRAK

Kanker adalah sekelompok penyakit yang timbul apabila sebuah sel atau sekelompok sel lepas dari kontrol yang mengatur pertumbuhan. Ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) merupakan salah satu tanaman obat yang digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan kanker. Ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) mempunyai kandungan zat aktif berupa melatonin dimana melatonin merupakan senyawa yang sudah diteliti para peneliti dunia sebagai obat antikanker dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) terhadap ekspresi COX-2 pada sel T47D. Ganggang hijau diekstraksi dengan menggunakan alat Soxhlet dengan pelarut etanol 96%. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok yaitu kontrol sel, pemberian ekstrak etanol ganggang hijau konsentrasi 247,668 µg/ml dan 123,834 µg/ml. Untuk memastikan adanya ekspresi COX-2 dilakukan uji imunositokimia secara tidak langsung. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya untuk melihat dan menghitung persen ekspresi COX-2. Hasil yang didapatkan menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna penurunan ekspresi COX-2 pada tiap kelompok. Jadi dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) mampu menurunkan ekspresi COX-2 pada sel T47D. Kata kunci: Ganggang Hijau, *Spirogyra sp.*, COX-2, sel T47D, imunositokimia.

PENDAHULUAN

Kanker adalah sekelompok penyakit yang timbul apabila sebuah sel atau sekelompok sel lepas dari kontrol yang mengatur pertumbuhan. Sel kemudian mulai berkembang biak dan menyebar (King, 2000). Data WHO menunjukkan, peningkatan jumlah penderita kanker setiap tahunnya mencapai 6,25 juta orang. Sebanyak dua pertiga dari penderita kanker tersebut berasal dari Negara berkembang, termasuk Indonesia. Di

Indonesia diperkirakan terdapat kasus kanker baru sebanyak 1 per 1000 penduduk pertahun (Sujudi, 2003).

Pengobatan kanker pada umumnya adalah terapi kombinasi bersama antara sitostatika, pembedahan dan terapi radiasi. Usaha penyembuhan kanker menggunakan obat (farmakoterapi) maupun dengan senyawa kimia (kemoterapi) pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang memuaskan karena usaha-usaha tersebut diatas kurang selektif dan kurang aman, karena ternyata juga mengenai sel-sel normal (Ganiswara, et.al., 1995).

Corresponding author : Wahyu Widyaningsih
E-mail: syifaniputri@yahoo.com

Sejak jaman dahulu masyarakat Indonesia telah mengenal dan menggunakan ramuan tradisional untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit, baik itu dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan, maupun hewan. Obat tradisional yang digunakan biasanya dikembangkan atas dasar pengalaman dan informasi dari orang lain atau para pendahulunya yang sudah menggunakan obat tersebut. Ganggang hijau merupakan salah satu obat tradisional antikanker yang berkembang dimasyarakat luas. Namun untuk dapat benar-benar diakui sebagai obat antikanker, maka perlu ditunjang dengan data-data laboratories dan klinis yang adapt diupayakan melalui penelitian secara ilmiah. Beberapa penelitian mengenai khasiat ganggang hijau sebagai obat antikanker telah dilakukan yaitu Ganggang telah terbukti memiliki aktifitas farmakologi sebagai anti bakteri dan bakterisidal (Taskin dan Kurt, 2007), antiinflamasi dan anti tumor. Ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) merupakan tanaman dengan kandungan zat aktif berupa *phytomelatonin* (Kolar, 2001). *Phytomelatonin* adalah senyawa *melatonin* yang terdapat dalam tanaman (*phyto*).

Kanker berkembang melalui berbagai tahap, salah satunya adalah angiogenesis. Angiogenesis merupakan langkah yang krusial bagi tumor untuk berubah dari ukuran yang kecil dan tidak berbahaya menjadi besar, bersifat malignan, dan dapat menyebar ke organ yang lain. Identifikasi dan karakterisasi terhadap faktor-faktor angiogenik merupakan hal yang sangat penting dalam usaha pengobatan kanker. Diduga bahwa apabila ada agen-agen kimia yang mempunyai kemampuan menghambat neovaskularisasi, maka agen kimia tersebut berpotensi besar dalam terapi kanker dan pengobatan berbagai penyakit lain yang berhubungan dengan abnormalitas peristiwa angiogenesis, seperti *diabetic retinopathy*, *macular degeneration*, *arthritis*, *psoriasis* dan *glaucoma* (Folkman, 1996).

Mekanisme COX-2 dalam menghambat kanker berhubungan dengan penghambatan angiogenesis dan melibatkan PGE2. Siklooksigenase-2 menstimulasi pembentukan PGE2 oleh asam arakidonat, selanjutnya mempengaruhi *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF) dan *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF) merupakan factor penting dalam proses angiogenesis dan terekspresi pada sel kanker payudara (Toi, et al., 1996)

Penelitian ini diharapkan akan menjawab pertanyaan apakah ekstrak etanol ganggang hijau mempunyai potensi sebagai antiangiogenesis,

khususnya melalui penurunan ekspresi COX-2 pada sel T47D sehingga dapat dijadikan bukti ilmiah untuk pengembangan penelitian bagi pengobatan kanker pada manusia khususnya kanker payudara..

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari timbangan neraca analitik AND GR 202, alat Soxhlet, *waterbath*, LAF (*Laminer air flow*), *tissue culture flask*, *incubator CO₂*, *vortex*, *conical tube 15 ml*, *white tip*, *blue tip*, *yellow tip*, *hemocytometer*, *24-plate well*, *mikropipet* (Socorex), *ependorf*, *aluminium*, *coverslip*, *object glass*.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ganggang hijau yang diperoleh dari desa Rowo Jombor, Kecamatan Bayat, Kabupaten Klaten, Jawa Tengah pada bulan April 2013, etanol 96% teknis (Brataco Chemica), asam asetat 15% Merck, HCl 1%, n-butanol Merck, silica gel GF 254 Merck, sel T47D (*berasal dari koleksi atau hasil kultur dari lab. Parasitology FK UGM*), DMSO, media kultur (RPMI), tripsin, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*)-0,5 % fungison-2% antibiotic penisilin dan streptomisin (GIBCO), PBS, *aquadest*, reagen imunositokimia meliputi methanol, H₂O₂ : air (1:9), *blocking serum*, antibodi monoclonal primer untuk antigen yang akan diamati COX-2 (*koleksi dari lab. Parasitology FK UGM*), antibodi sekunder (biotin), streptavidin, DAB, meyer hematosiklin, alcohol 95% dan *xylo*.

Penyiapan Ekstrak Ganggang Hijau

Ganggang hijau yang telah kering dilakukan sortasi kering, kemudian dilakukan proses penyerbukan. Ganggang hijau yang sudah dalam bentuk serbuk dilakukan ekstraksi dengan etanol 96% dengan metode *Soxhlet*. Pelarut yang digunakan sebanyak 2 kali sirkulasi. Sari etanol ganggang hijau kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* suhu 40°C-50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Dilanjutkan dengan penguapan pada *waterbath* pada suhu 50°C -60°C hingga diperoleh ekstrak yang benar-benar kental.

Identifikasi Senyawa Alkaloid pada Ekstrak Etanol

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 UV⁷.

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 daya hambat angiogenesis

Sel (kepadatan 3 x 10⁴ sel/semuran) sebanyak 2 ml ditanam pada *coverslip* dalam mikrolate 24 sumuran kemudia 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. Methanol 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 (Background smper). *Coverslips* lalu diberi penambahan antibody primer COX-2 sebanyak 100 µl lalu ditunggu/didiamkan selama satu jam pada suhu kamar. Hasil inkubasi dengan antibody COX-2 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 penjernihan dengan *xylol*.Setelah kering *coverslips* ditutup dengan kaca penutup menggunakan perekat (*mounting media*) dan diamati dengan mikroskop cahaya untuk melihat ekspresi COX-2.

Analisis Data

Ekspresi protein diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak berekspresi memberikan warna ungu/biru. Data ditentukan dengan menghitung rata-rata persen ekspresi COX-2 terhadap jumlah keseluruhan sel. Rata-rata persen ekspresi dapat dihitung dengan membandingkan antara jumlah COX-2 terhadap jumlah keseluruhan sel.

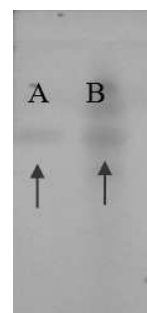
Data yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus:

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

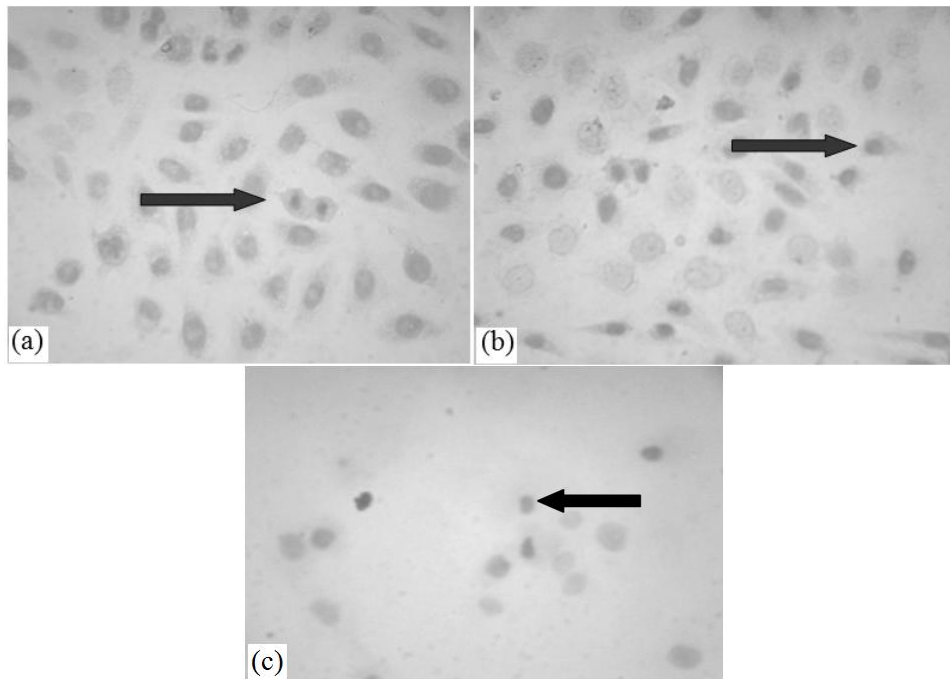
Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol

Hal identifikasi menunjukkan bahwa larutan uji mengandung senyawa golongan alkaloid. Identifikasi senyawa melatonin dalam larutan uji dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil identifikasi senyawa melatonin dengan Kromatografi Lapis Tipis. (A) : standard melatonin(B) : larutan sampel. FD: *plate* silika gel GF. FG *n*-butanol : asam asetat : air (12 : 3 : 5).

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.



Gambar 1. Foto mikroskopis hasil imunositokimia COX-2 pada sel T47D, (a) control sel (b) pemberian ekstrak etanol konsentrasi 123.834µg/mL (c) 247.668µg/mL. Perbesaran 40x ➡Tidak mengekspresikan ➡ mengekspresikan

Tabel. I Ekspresi COX-2 pada sel T47D

Ekspresi COX-2	% Rata-rata ekspresi
Kontrol Sel	90.19 %
123. 834 µg/ml	72.43 %
247.668 µg/ml	19.23 %

Pengamatan Imunositokimia pada COX-2

Ekspresi COX-2 diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40x dengan bantuan optilab. Sel T47D yang mengekspresikan COX-2 berwarna coklat pada sitoplasmanya dan yang tidak mengeksterikan hanya berwarna biru karena pengecetan hematosiklin. Hasil pengamatan pada sel T74D dengan atau tanpa adanya penambahan ekstrak etanol ganggang hijau dapat dilihat pada Gambar 2 dan tabel I. Ekspresi COX-2 pada perlakuan mengalami penurunan dibandingkan dengan tanpa adanya pemberian ekstrak etanol ganggang hijau (Kontrol). Ekspresi COX-2 tersebut dihambat akibat perlakuan pemberian ekstrak etanol ganggang hijau dimana semakin besar konsentrasi maka semakin kecil % rata-rata ekspresinya, sehingga menunjukkan bahwa ekstrak etanol ganggang hijau memiliki efek penghambatan terhadap protein COX-2. Pada pengamatan yang dilakukan terlihat bahwa sel kontrol memiliki %

rata-rata ekspresi sebesar 90,19 % yang jauh lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan yaitu untuk konsentrasi 123. 834 µg/mL dan 247.668 µg/mL secara berturut-turut sebesar 72.43 %, 19.23 % hal ini berarti bahwa pemberian ekstrak etanol ganggang hijau memiliki aktivitas terhadap penurunan ekspresi COX-2. Jika dibandingkan antara kedua konsentrasi pemberian ekstrak etanol ganggang hijau terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan semakin kecil pula % ekspresi dari COX-2 yang berarti bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak ganggang hijau yang diberikan berarti semakin besar pula kemampuannya untuk menurunkan ekspresi dari COX-2 pada sel T47D.

Siklooksigenasi-2 memiliki mekanisme untuk menghambat kanker melalui berbagai mekanisme. Salah satu produk utama dari COX-2 yaitu PGE2 dapat berefek sebagai antikanker dengan memodulasi proliferasi sel, kematian sel, dan invasi tumor pada berbagai jenis kanker

termasuk usus besar, payudara, dan paru-paru (Breyer, *et al.*, 2001). Penghambatan terhadap COX-2 dapat menyebabkan penekanan perubahan asam arakidonat menjadi PGE2. Asam arakidonat menstimulasi aktifitas enzim spingomielinase untuk mengkatalisasi perubahan spingomielin menjadi *ceramide*. *Ceramide* merupakan suatu inductor apoptosis yang poten (Lema, 2002). Menurunnya perubahan asam arakidonat menjadi PGE2 menyebabkan jumlah *ceramide* yang dihasilkan semakin besar. Maka diduga kemampuan ekstrak etanol ganggang hijau menginduksi apoptosis pada sel T47D adalah melalui penekanan ekspresi COX-2, sehingga meningkatkan induktor apoptosis yaitu *ceramide* sehingga dapat menyebabkan apoptosis.

Mekanisme COX-2 dalam menghambat kanker berhubungan dengan penghambatan angiogenesis dan melibatkan PGE2. Siklooksigenase-2 menstimulasi pembentukan PGE2 oleh asam arakidonat, selanjutnya mempengaruhi *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF) dan *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF) merupakan factor penting dalam proses angiogenesis dan terekspresi pada sel kanker payudara (Toi, *et al.*, 1996) VEGF mengatur proses angiogenesis dengan mengawali pertumbuhan pembuluh darah baru dengan membawa oksigen dan nutrisi sehingga tumor bias membesar. Metastase (pertumbuhan tumor baru) terjadi akibat perpindahan sel tumor melalui pembuluh darah baru ke bagian tubuh yang lain. Penghambatan reseptor kinase dari VEGF, *fibroblast*, dan platelet-platelet turunan factor pertumbuhan tersebut dapat menghambat pertumbuhan tumor.

Senyawa-senyawa penghambat COX-2 telah diteliti memiliki mekanisme sebagai antikanker payudara dengan menghambat proliferasi dari sel kanker tersebut. Pada sel-sel kanker ekspresi berlebih COX-2 akan berakibat pada produksi berlebih prostanoid yang dapat menyebabkan peningkatan proliferasi sel. Meningkatkan proliferasi sel tersebut disebabkan karena meningkatnya onkogen seperti Ras yang merupakan gen pengaktivasi proliferasi. Penghambatan terhadap COX-2 oleh celecoxib pada *Burkitt's lymphoma cell lines RAJI, Bjab, Epstein Barr virus negative, dan BL41* juga menyebabkan penurunan proliferasi sel kanker (Sobolweski, *et al.*, 2010).

Beberapa senyawa alam juga memiliki mekanisme sebagai antikanker dengan menghambat COX-2. Senyawa bromelain yang terkandung pada nanas (*Ananas cosmosus*) dapat menghambat ekspresi COX-2, menginaktivasi

NFkB, meningkatkan p53 and Bax, selanjutnya mengaktivasi kaspase 3 dan kaspase 9 dengan menurunkan ekspresi Bcl-2. Kurkumin, kumarin, sulforapan, apigenin *nontoxic*, dan flavonoid fisetin memiliki mekanisme sebagai antikanker yang dipengaruhi oleh keberadaan COX-2¹¹.

Beberapa jenis flavonoid juga mampu menghambat aktivitas protein kinase dengan menduduki *ATP binding site protein kinase* sehingga menurunkan aktivitas kinasanya (Murkies *et al.*, 1998). Protein kinase terdiri dari protein kinase A (PKA) dan protein kinase C (PKC) yang teraktivasi oleh enzim COX-2. Penghambatan dari PKC dapat menurunkan produksi dari interleukin-8 (IL-8) dan menurunkan penyerangan sel T47D oleh COX-2. Beberapa protein kinase juga berperan penting pada jalur antiapoptosis dan angiogenesis (Kerbel and Folkman, 2001).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol ganggang hijau (*Spirogyra sp.*) mampu menurunkan ekspresi COX-2 pada sel T47D dengan konsentrasi 247,668 µg/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- King, R. J. B., 2000, *Cancer Biology* 2nd ed, Pearson Education Limited, London
- Sujudi, Achmad. 2003. *Investasi kesehatan untuk pembangunan ekonomi*. departemen kesehatan RI. Jakarta.
- Ganiswara, S., Setiabudy, R., Sjamsudin, U., Bustami, Z., 1995, *Farmakologi dan Terapi*, Ed Ke4, Bagian Farmakologi Universitas Indonesia, Jakarta.
- Taskin, E., dan Kurt, O., 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology* 6(24) 274-275.
- Kolar J, Machankova I. 2001. Occurrence and possible function of melatonin in plants. *Endocytobiosis and Cell Res* 14 (1) : 75-84.
- Folkman, J., 1996, Tumor angiogenesis therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.*, 285: 1182-1186
- Prabowo A, 2009, Pemanfaatan phytomelatonin ganggang hijau (*Spirogyra Sp.*) sebagai cancer activity inhibitor dari induksi logam berat, *PKM*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Breyer B., Jiang, W., Cheng, H., Zhou, L., Paul, R., Feng, T., He, T.-C., 2001, Adenoviral vector-

- mediated gene transfer for human gene therapy, *Curr Gene Ther*, 1:149-162.
- Lema, M.J., 2002, Coxib Therapy and Colorectal Cancer: Emerging options with coxib therapy, *Cleve Clin J Med*, 69: 176-184,
- Toi, M., Kondo, S., Suzuki, H., Yamamoto, Y., Inada, K., Imazawa, T., Taniguchi, T. and Tominaga, T., 1996, Quantitative analysis of vascular endothelial Growth factor in primary breast cancer. *Cancer*, 77: 1101-1106.
- Sobolewski, C., Claudia, C., Mario, D., Lina, G., Marc, D., 2010, The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies, *International journal of cell biology*.
- Kerbel, R., and Folkman J., 2001, Clinical Translation of Angiogenesis inhibitor, *Nature Rev.*, 2: 727-739