

Efek Timoquinon terhadap Apoptosis pada Sel Kanker Serviks Susianti

Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi kanker diantaranya melalui pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Tanaman obat sudah banyak diteliti memiliki efek antikanker. Timoquinon yang merupakan komponen mayor dari jinten hitam diketahui memiliki efek kemoterapi dan kemoprevensi. Dalam penelitian ini timoquinon diujikan pada sel HeLa yang merupakan *cell line* kanker serviks untuk melihat adanya efek apoptosis yang ditimbulkan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini ada 2 tahapan, yaitu uji sitotoksik menggunakan MTT assay dan Uji apoptosis menggunakan metode Annexin V. Pada uji sitotoksik menggunakan MTT assay didapatkan IC50 sebesar 30 µg/mL. Selanjutnya dilakukan uji apoptosis menggunakan Annexin V. Sel HeLa dimasukkan ke dalam mikrokultur, lalu diinkubasi selama 24 jam. Kemudian media diganti dan diberi bahan uji sesuai dengan kelompok uji yaitu K (dosis timoquinon 0), P1 (1/2xIC50), P2 (IC50) dan P3 (2xIC50). Mikrokultur diinkubasi kembali selama 24 jam. Media kultur masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan 1000 µL PBS, lalu ditambahkan 200 µL tripsin- EDTA 0,25% lalu diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Masing-masing sumuran dimasukkan 1000 µL media kultur (RPMI) lalu diresuspensi dan diberikan reagen Annexin V-PI, kemudian sel siap untuk diinjeksi pada alat flowsitometer. Data persentase sel yang mengalami apoptosis masing-masing adalah K=2,835%, P1=2,95%, P2=3,06%, P3= 75,56, lalu diuji menggunakan uji statistik *One Way Anova* dan diperoleh nilai $p=0,00$. Simpulan: timoquinon dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks. [JK Unila. 2016; 1(2): 267-271]

Kata kunci: , apoptosis, flowsitometri, HeLa, kanker serviks, timoquinon

Thymoquinone Effect to Apoptosis on Cervical Cancer Cell

Abstract

There are many way to against cancer such as operation, radioterapy, and chemotherapy. Many kind of medicinal plant have been investigated has anticancer effect. Thymoquinone a major component of black seed have been known has chemotherapy and chemoprevention effect. In this research, thymoquinone had been tested on HeLa cell that is cervical cancer cell line to show apoptosis effect because of thymoquinone. The methode will be divided in two step. The first step is cytotoxicity test using MTT assay, and apoptosis test using Annexin V. The IC50 as a result of cytotoxic test is 30 µg/mL. After that, the research continued with apoptosis test using Annexin V. HeLa cell administered into microculture plate, and incubated. Culture medium was exchanged with new one and administered by testing agent based on testing group consist of K (dose of thymoquinone 0), P1 (1/2xIC50), P2 (IC50) and P3 (2xIC50). The microculture reincubated. Culture medium in every well was eliminated and washed by 1000 µL PBS, added by 200 µL tripsin- EDTA 0,25%, and then incubated at 37°C in 5 minutes. Every well was administered by 1000 µL culture medium (RPMI), resuspended and then administered by Annexin V-PI reagent. The cell had been already to inject into flowcytometer. The percent data of apoptotic cell for each group is K=2,835%, P1=2,95%, P2=3,06%, P3= 75,56, and then analyzed by *One Way Anova* statistical test with p value=0,00. From the data in this research can be concluded that thymoquinone can induce apoptosis in cervical cancer. [JK Unila. 2016; 1(2): 267-271]

Keywords: apoptosis, cervical cancer, flowcytometry, HeLa, thymoquinone

Korespondensi: dr. Susianti, M.Sc, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Jl. Prof.Dr. Soemantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung, HP 08127899978, e-mail susiantigl@yahoo.com.

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Diperkirakan kasus kanker tahunan akan meningkat dari 14 juta pada 2012 menjadi 22 juta dalam dua dekade berikutnya. Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4‰ atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Penyakit kanker serviks dan payudara merupakan

penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013, yaitu kanker serviks sebesar 0,8‰ dan kanker payudara sebesar 0,5‰.¹

Tingginya angka kejadian kanker pada umumnya dan kanker serviks khususnya memerlukan suatu usaha yang efektif untuk menangani masalah tersebut. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi kanker diantaranya melalui pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi.² Penggunaan obat dari bahan alam cukup luas

dimasyarakat. Selain dianggap tidak memiliki efek samping yang merugikan, dari aspek ekonomi obat herbal dianggap cukup murah dibandingkan dengan obat modern.³ Dengan kemampuan mengeliminasi baik sel-sel prekanker maupun kanker, maka apoptosis tidak hanya potensial dalam kemoterapi tetapi juga dalam kemoprevensi.⁴

Timoquinon yang merupakan komponen mayor dari jinten hitam diketahui memiliki efek kemoterapi dan kemoprevensi. Dengan menggunakan flowsitometri dibuktikan bahwa timoquinon dapat mengurangi fosforilasi STAT3, serta menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-XL pada human multiple myeloma Cells (MM cells).⁵ Timoquinon dapat menghambat angiogenesis dengan cara menekan AKT dan ERK.⁶ Timoquinon menghambat proliferasi, menginduksi apoptosis pada human *multiple myeloma cells* melalui *STAT3 pathway*.⁷ Timoquinon meningkatkan ekspresi PTEN dan menginduksi apoptosis pada breast cancer cells (MCF-7) yang resisten terhadap doksorubisin serta dengan cara meningkatkan P53, P21 dan bax serta menurunkan Bcl-2.⁸

Dalam penelitian ini timoquinon diujikan pada sel HeLa yang merupakan *cell line* kanker serviks untuk melihat adanya efek apoptosis yang ditimbulkan.

Metode

Untuk mengetahui efek timoquinon terhadap apoptosis pada sel kanker serviks di dalam penelitian ini digunakan sel kanker serviks berupa *cell line* HeLa yang ada di Laboratorium Parasitologi FK UGM. Sedangkan timoquinon yang digunakan adalah timoquinon sintesis yang dibeli di Sigma Aldrich Singapore.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ada 2 tahapan, yaitu uji sitotoksik menggunakan MTT *assay* dan Uji apoptosis menggunakan metode *Annexin V*. Pada uji sitotoksik menggunakan MTT *assay* didapatkan dosis timoquinon yang dapat membunuh 50% sel HeLa yang disebut dosis IC50 sebesar 30 µg/mL. Selanjutnya dilakukan uji apoptosis menggunakan *Annexin V*. Dosis timoquinon yang digunakan pada uji ini adalah berdasarkan dosis IC50 yang

didapatkan dari uji sitotoksik sebelumnya, dimana dosis IC50 adalah 30 µg/mL.

Sel HeLa dimasukkan ke dalam mikrokultur. Masing-masing sumuran diisi dengan sel sebanyak 3×10^4 sel/sumuran dalam media sebanyak 500 µl (FBS 0,5%). Mikrokultur diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian media pada mikrokultur dibuang dengan cara dipipet. Lalu diganti dengan media (FBS 10%) dan diberi bahan uji sesuai dengan kelompok uji. Kelompok uji dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu K (dosis timoquinon 0), P1 (1/2xIC50), P2(IC50) dan P3 (2xIC50). Masing-masing dosis terdapat 2 pengulangan. Mikrokultur diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator.

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap sampel, dilakukan pembuatan reagen flowsitometri terlebih dahulu. Pembuatan reagen flowsitometri untuk analisis apoptosis yang digunakan 1 sampel dilakukan dengan mengambil buffer sebanyak 100 µL, propidium iodida (PI) sebanyak 2 µL dan Annexin-V sebanyak 2 µL lalu dicampur. Satu sumuran membutuhkan 650 µL buffer, 12 µL PI, dan 12 µL Annexin-V. *Eppendorf* dibungkus dengan aluminium foil, karena reagen tidak tahan terhadap cahaya. Pembuatan reagen ini dilakukan dengan sarung tangan karena senyawa karsinogen.⁹

Setelah pembuatan reagen flowsitometri, tahap berikutnya adalah persiapan sampel. Satu konikel disiapkan untuk satu jenis perlakuan serta diberi penanda pada masing-masing konikel. Media diambil dari sumuran dengan mikropipet 1 mL dan dipindahkan ke konikel. Masing-masing sumuran dimasukkan 1000 µL PBS untuk mencuci sel dan membersihkan serum yang berasal dari media, karena serum tersebut dapat menghambat kerja tripsin. Kemudian PBS diambil dengan mikropipet lalu dipindahkan ke dalam konikel. Pada masing-masing sumuran ditambahkan 200 µL tripsin-EDTA 0,25% agar sel terlepas satu per satu lalu diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Masing-masing sumuran dimasukkan 1000 µL media kultur (RPMI) dengan mikropipet lalu diresuspensi. Sel diamati dengan mikroskop hingga terlihat sel terlepas satu per satu.

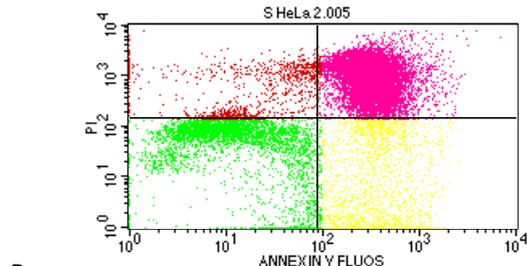
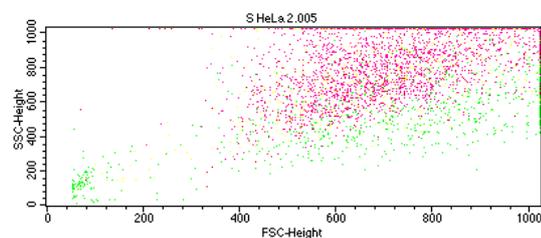
Media kultur yang berada di sumuran dipindahkan ke dalam konikel lalu konikel disentrifus pada 600 rpm selama 5 menit. Media dibuang dengan cara dituang lalu dicuci masing-masing *pellet* dengan 500 μ L PBS dingin dengan cara diresuspensi agar *pellet* yang mengendap dibawah menjadi larut dalam PBS. *Pellet* tersebut dipindahkan ke dalam *eppendorf* dan disentrifus pada 2000 rpm selama 3 menit dan sel siap untuk diuji dengan flowsitometer. Media pada tabung *eppendorf* dibuang, lalu dimasukkan 100 μ L reagen Annexin V-PI ke dalam tabung *eppendorf* dan buffer sebanyak 350 μ L. Agar bercampur maka divorteks, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan tempat gelap selama 10 menit. Suspensi sel tersebut dipindahkan ke *flowcyto-tube*. Suspensi sel siap untuk diinjek pada alat flowsitometer. Pengamatan induksi apoptosis dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis.

Metode flowsitometri mampu membedakan sel hidup, apoptosis awal, apoptosis akhir dan nekrosis, karena reagen Annexin V dan PI bekerja secara selektif mengikat sel yang utuh maupun tidak utuh.⁹ Data persentase sel yang mengalami apoptosis akan diuji menggunakan uji statistik *One Way Anova*.

Hasil

Hasil uji induksi apoptosis flowsitometri diperoleh hasil pada Gambar 1.

A.



B.

Gambar 1. Hasil flowsitometri

A. Berdasarkan sumbu X dan Y

B. Persebaran sel berdasarkan kuadran

Data persebaran sel (Gambar 1A) menghubungkan diameter sel pada sumbu X atau bagian FSC (*forward-angle light scatter*) dan konformasi struktur sel pada sumbu Y atau bagian SSC (*side-single light scatter*). Persebaran sel apoptosis pada FSC akan menurun dan pada SSC akan menaik, sedangkan persebaran sel nekrosis pada FSC akan menaik dan SSC akan menurun. Dari data persebaran sel tersebut agar memudahkan analisis, maka warna-warna yang terbentuk dipisahkan dengan metode *cell quest* (Gambar 1B). Data diperoleh 4 macam warna, yakni hijau menunjukkan sel hidup, kuning menunjukkan apoptosis awal, merah muda menunjukkan apoptosis akhir, dan merah menunjukkan nekrosis. Warna tersebut bisa terbentuk disebabkan oleh sel yang memancarkan epi-fluoresensi oleh ikatan AnnexinV atau PI lalu ditangkap oleh sinar UV. Panjang gelombang warna hijau pada 488 nm –

525 nm, absorbansi maksimal berada pada 490 nm. Pada apoptosis awal akan berfluoresensi kuning dengan intensitas yang lemah pada panjang gelombang 536 nm – 617 nm. Sel yang mengalami nekrosis atau apoptosis akhir akan berfluoresensi merah pada panjang gelombang 650 nm – 700 nm.⁹

Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa pada kelompok P3 dengan dosis timoquinon 2xIC50 atau 60 μ g/mL persentase sel yang mengalami kematian secara apoptosis adalah paling tinggi, yaitu 75,56%. Sedangkan pada kelompok kontrol yang tidak menggunakan timoquinon sel yang mengalami apoptosis hanya 2,835%. Demikian juga sel yang mengalami nekrosis juga semakin meningkat. Namun persentase nekrosis tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan apoptosis. Dari Uji Statistik *One Way Anova* terhadap persentase apoptosis antar kelompok uji diperoleh nilai $p=0,00$ atau kurang dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa hasilnya bermakna. Sedangkan Uji *Post Hoc* LSD menunjukkan perbedaan yang paling kuat adalah antara kelompok P3 dengan semua kelompok yang lain.

Tabel 1. Persentase sel HeLa hidup, apoptosis dan nekrosis setelah pemberian timoquinon

Kelompok	Rata-rata persentase sel				
	Hidup	Apoptosis Awal	Apoptosis Akhir	Apoptosis	Nekrosis
K	95,965	1,505	1,505	2,835	1,2
P1	95,88	1,445	1,505	2,95	1,18
P2	95,695	1,5	1,56	3,06	1,25
P3	19,175	16,505	59,05	75,56	5,345

Pembahasan

Dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa semakin meningkatnya dosis timoquinon semakin meningkat pula sel yang mengalami kematian baik melalui mekanisme apoptosis maupun nekrosis. Hal ini menunjukkan bahwa timoquinon memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa yang merupakan sel kanker serviks. Efek antikanker timoquinon ini sudah banyak dibuktikan di dalam penelitian sebelumnya. Timoquinon diketahui dapat menghambat proliferasi dan viabilitas kanker prostat^{10,11}, *human multiple myeloma Cells (MM cells)*^{5,7}, sel kanker payudara (MCF-7)⁸, kanker kolon dan kanker paru.^{11,12}

Mekanisme sitotoksik yang ditunjukkan dari penelitian ini paling dominan adalah melalui apoptosis. Meskipun dari data yang didapatkan menunjukkan adanya nekrosis, namun tidak terlalu signifikan jika dibandingkan dengan persentase sel yang mengalami apoptosis. Pada penelitian-penelitian sebelumnya memang sudah dibuktikan adanya efek apoptosis timoquinon ini pada berbagai jenis kanker, namun bukan pada kanker serviks. Timoquinon telah dibuktikan dapat menginduksi apoptosis pada *human multiple myeloma cells*⁷, pada sel kanker payudara (MCF-7) yang resisten terhadap doksorubisin⁸ serta *head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*¹³ dan *Acute Lymphoblastic Leukaemia*.¹⁴ Dengan demikian dalam penelitian ini dapat dibuktikan bahwa timoquinon memiliki apoptosis pada sel kanker serviks khususnya sel HeLa. Mengenai bagaimana mekanisme terjadinya apoptosis pada kanker serviks perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa timoquinon dapat membunuh sel kanker serviks dengan cara menginduksi apoptosis.

Daftar Pustaka

1. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Situasi Penyakit Kanker, 2015.
2. Thurston DE. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. NewYork: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2007.
3. Dwiprahasto I. Pertimbangan Ilmiah Penggunaan *Herbal Medicine* dalam Praktek. Makalah dalam Seminar Aplikasi Herbal dalam Praktek Kedokteran. Yogyakarta: FK UGM; Tanggal 11 Januari 2009.
4. Sun S, Hail JN, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancerchemoprevention. *J Nat Cancer Inst.* 2004; 96 (9): 662-272.
5. Badr G, Mohany M, Abu-Tarboush F. Thymoquinone decreases F-actin polymerization and the proliferation of human multiple myeloma cells by suppressing STAT3 phosphorylation and Bcl2/Bcl-XL expression. *Lipids in Health and Diseas.* 2011; 10:236.
6. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, et al. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and ERK signaling pathways. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(7): 1789-96.
7. Li F, Rajendran P, Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathwaybph. *Br J Pharmacol.*2010; 161: 541–54.
8. Arafa EA, Zhu Q, Shah ZI, WaniG, Barakat BM, Racoma I, et al. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat Res.* 2011;706(1-2): 28–35.
9. Azizah Mn. Penentuan Potensi Induksi Apoptosis Tilirosida dari Ekstrak Daun Jati

- Belanda (*Guazuma Ulmifolia* Lamk.) terhadap Sel T47d dengan Metode *Flow Cytometry* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2015.
10. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, et al. Androgen Receptor and E2F-1 Targeted Thymoquinone Therapy for Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res* 2007;67:7782-8.
 11. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83: 443-51.
 12. Ulasli SS, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, et al. Anticancer Effects of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Benzo(a)pyrene. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14,: 6159-64.
 13. Chu SC, Hsieh YS, Yu CC, Lai YY, Chen PN. Thymoquinone Induces Cell Death in Human Squamous Carcinoma Cells via Caspase Activation-Dependent Apoptosis and LC3-II Activation-Dependent Autophagy. *Plos One.* 2014: 9(7): 1-12.
 14. Salim LZA, Mohan S, Othman R, Abdelwahab SI, Kamalidehghan B, Sheikh BY, et al. Thymoquinone Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukaemia *in Vitro*. *Molecules.* 2013; 18: 11219-40.