

ABSTRAK

EFEK ANTIMETASTASIS ISOLAT RIMPANG *Etilingera alba* A.D. Poulsen TERHADAP MIGRASI SEL DAN EKSPRESI GEN *CD44* DAN *FAK* PADA LINI SEL KANKER PAYUDARA MDA-MB-231

Oleh :
WAHYUNI
NPM : 260130190005

Kanker payudara mempunyai prevalensi cukup tinggi serta penyebab utama kedua mortalitas di seluruh dunia. Penyebab kematian tersebut akibat terjadinya metastasis yang sampai saat ini belum ada pengobatan spesifiknya. Kanker yang bermetastasis dapat ditangani dengan metode kemoterapi, namun resistensi multi obat menjadi penyebab terjadinya kegagalan. Penelitian menunjukkan bahwa resistensi kemoterapi dapat dilakukan dengan penghambatan reseptor adhesi permukaan sel *CD44* yang berperan dalam lokalisasi *Matriks Metalloproteinase* pada jalur pensinyalan NF- κ B. Pada jalur ini, *MMP-1* juga dapat menginduksi *FAK* sehingga penekanan pada gen ini diharapkan mampu menghambat terjadinya metastasis. Upaya penemuan obat sebagai terapi antikanker dapat dilakukan dengan mengeksplorasi bahan bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang potensial dan selektif dengan menggunakan pendekatan biomolekuler. *Etilingera* merupakan genus tumbuhan dari famili *Zingiberaceae* yang memiliki jumlah spesies besar dengan potensi aktivitas yang menarik. Salah satunya adalah *Etilingera elatior* yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel line CEM-SS, MCF-7 dan sel leukemia P-388, aktivitas anti-tumor terhadap MDA-MB-231 dan MCF-7. Populasi *Etilingera* di Pulau Sulawesi tumbuh sekitar 48 spesies dengan 7 spesies endemik berada di Sulawesi Tenggara, salah satunya adalah *E. alba*. Studi kimia dan farmakologi dari spesies ini belum banyak diketahui sehingga menjadi daya tarik bagi peneliti untuk melakukan isolasi kandungan senyawa kimia dari rimpang *E. alba* dan melakukan pengujian efek antimetastasisnya. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi senyawa kimia dari rimpang *E. alba*, menentukan struktur molekulnya, mengetahui efek sitotoksitasnya serta efek antimetastasis senyawa tersebut terhadap migrasi sel serta ekspresi gen *CD44* dan *FAK* pada lini sel kanker payudara *MDA-MB-231*. Tahapan penelitiannya yaitu isolasi senyawa dari rimpang *E. alba* yang meliputi ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian; penentuan struktur dengan identifikasi spektroskopi IR, NMR dan spektroskopi massa; pengujian sitotoksik serta pengujian aktivitas senyawa kimia tersebut terhadap migrasi sel dan ekspresi gen *CD44* dan *FAK* pada lini sel kanker payudara *MDA-MB-231*.

Hasil determinasi dari LIPI Biologi Cibinong menjelaskan bahwa tumbuhan yang diperoleh dari Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara adalah spesies *E. alba*. Sebanyak 5,5 kg rimpang *E. alba* dimaserasi dengan 40 L pelarut etanol 96% selama 3x24 jam. Pemekatan filtrat menggunakan *rotary evaporator* memperoleh 160 gram ekstrak pekat dengan rendamen 2,91%. Proses

fraksinasi dan pemurnian senyawa-senyawa kimia dilakukan dengan berbagai teknik kromatografi, yaitu kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi radial. Analisis KLT ekstrak pada fasa gerak heksan:etilasetat (v/v) 9:1, 5:5, dan 1:9 menunjukkan pola pemisahan yang baik, sehingga dijadikan sebagai acuan pada pemisahan. Seluruh ekstrak dipisahkan dengan teknik kromatografi vakum cair (KVC). Kromatogram analisis KLT hasil KVC mendeskripsikan sebaran pemisahan senyawa kimia, dan selanjutnya fraksi dengan spot senyawa yang sama digabungkan untuk mendapatkan kelompok fraksi yang lebih sederhana. Enam fraksi hasil pemisahan KVC menunjukkan pola senyawa yang cukup berbeda dan terdistribusi berdasarkan kepolarannya. Hasil skrining awal dengan uji CCK-8 terhadap sel MDA-MB-231 menghasilkan aktivitas sitotoksik dari masing-masing fraksi yaitu fraksi A 252.240 mg/L, fraksi B 65.433 mg/L, fraksi C 389.339 mg/L, fraksi D 262.500 mg/L, fraksi E 345.300 mg/L, fraksi F 1840.850 mg/L, ekstrak 453.358 mg/L, dan cisplatin 53.369 mg/L. Fraksi B yang menunjukkan aktivitas terbaik dengan nilai penghambatan mendekati cisplatin sebagai kontrol positif pengujian dan selanjutnya dimurnikan senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Sepuluh senyawa dari fraksi B berhasil diisolasi dan diidentifikasi struktur molekulnya berdasarkan spektroskopi FT-IR, NMR dan LC-MS/MS. Senyawa tersebut adalah *1,7-diphenyl-6-hepten-3-on (1)*, *sitostenon (2)*, *1,7-diphenyl-3-heptanol (3)*, *yakuchinone A (4)*, *7-(4''-hydroxy-3''- methoxyphenyl)-1-phenyl-hept-4-en-3-one (5)*, *3,5-dimethoxy-4-acetoxycinnamyl alcohol acetate (6)*, *oxyphyllacinol (7)*, *5-hydroxy-7-(4''-hydroxyphenyl)-1- phenyl-1-heptene (8)*, *1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-7-(4''-hydroxyphenyl)-3- heptanone (9)* dan *3,5-dimethoxy-4-acetoxycinnamyl alcohol (10)*.

Pengujian sitotoksik dengan uji CCK-8 isolat 7 (*oxyphyllacinol*) memiliki aktivitas sitotoksitas terbaik terhadap sel kanker payudara MDA-MD-231 dengan nilai IC_{50} 35,71 mg/L dengan kategori aktif. Isolat 7 (*oxyphyllacinol*) juga memiliki aktivitas antimetastasis terbaik terhadap penghambatan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231 dalam waktu 24 jam pada konsentrasi 50, 100 dan 200 mg/L sebesar 0,74; 0,36; dan 0,14 %. Isolat 3, 7, dan 8 berdasarkan statistik mampu menghambat ekspresi gen *CD44* sel kanker payudara MDA- MD-231 dengan tingkat ekspresi masing-masing sebesar 0,615; 0,6151; dan 0,7194. Isolat 4,5,8, dan 9 berdasarkan statistik mampu menghambat ekspresi gen *FAK* dengan tingkat ekspresi masing-masing sebesar 0,1128; 0,2501; 0,1862; dan 0,2403. Adanya pengaruh yang signifikan dalam menurunkan regulasi ekspresi gen penanda metastasis dalam hal ini *CD44* dan *FAK*, menjadikan temuan menjadi kandidat yang potensial sebagai anti metastasis dari bahan alam.

Kata kunci: *E.alba*, isolat, metastasis, migrasi sel, ekspresi gen, *CD44*, *FAK*

ABSTRACT

ANTIMETASTASIS EFFECT OF ISOLATED COMPOUNDS FROM *Etlingera alba* A.D. Poulsen TOWARDS CELL MIGRATION AND GENE EXPRESSION OF CD44 AND FAK IN MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE

Oleh :
WAHYUNI
NPM : 260130190005

Breast cancer has a high prevalence and is the second leading cause of mortality worldwide. The cause of death is due to the occurrence of metastases, for which, until now, there is no specific treatment. Metastatic cancer can be treated with chemotherapy methods, but multidrug resistance is the cause of failure. Research shows that chemotherapy resistance can be achieved by inhibiting the CD44 cell surface adhesion receptor, which plays a role in the localization of Matrix Metalloproteinase in the NF- κ B signaling pathway. In this pathway, MMP-1 can also induce FAK, so suppression of this gene is expected to inhibit the occurrence of metastasis. Drug discovery efforts as anticancer therapy can be made by exploring the potential and selective bioactive ingredients of Indonesian medicinal plants using a biomolecular approach. *Etlingera* is a genus of plants from the Zingiberaceae family, which has many species with interesting potential activities. One of them is *Etlingera elatior* which has a cytotoxic effect on CEM-SS line cells, MCF-7 and P-388 leukemia cells, and anti-tumor activity against MDA-MB-231 and MCF-7. The population of *Etlingera* on Sulawesi Island grew to about 48 species, with 7 endemic species in Southeast Sulawesi, one of which was *E. alba*. Chemical and pharmacological studies of this species are not widely known, so it has become an attraction for researchers to isolate chemical compounds from the rhizome of *E. alba* and test its antimetastatic effect. The purpose of this study was to isolate chemical compounds from the rhizome of *E. alba*, determine its molecular structure, knowing the cytotoxic effect and the antimetastatic effect of these compounds on cell migration and expression of CD44 and FAK genes in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. The research stages were the isolation of compounds from the rhizome of *E. alba*, which included extraction, fractionation, and purification; determination of structure by identification of IR spectroscopy, NMR, and mass spectroscopy; cytotoxic testing as well as testing the activity of these chemical compounds on cell migration and expression of CD44 and FAK genes in the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

The results of the determination from LIPI Biology Cibinong explained that the plants obtained from Konawe Selatan Regency, Southeast Sulawesi Province were species of *E. alba*. A total of 5.5 kg of *E. alba* rhizomes were macerated with 40 L of 96% ethanol solvent for 3x24 hours. The concentration of the filtrate using a

rotary evaporator obtained 160 grams of the concentrated extract with a yield of 2.91%. The process of fractionation and purification of chemical compounds is carried out by various chromatographic techniques, namely thin layer chromatography (TLC), liquid vacuum chromatography (KVC), and radial chromatography. TLC analysis of the extract on the mobile phase of hexane: ethylacetate (v/v) 9:1, 5:5, and 1:9 showed a good separation pattern, so it was used as a reference for separation. All extracts were separated by liquid vacuum chromatography (KVC) technique. The TLC analysis chromatogram of KVC results described the distribution of chemical compound separations, and then fractions with the same compound spot were combined to obtain simpler fraction groups. The six fractions from the KVC separation showed quite different compound patterns and were distributed based on their polarity. The results of the initial screening with CCK-8 test on MDA-MB-231 cells produced cytotoxic activity from each fraction, namely fraction A 252,240 mg/L, fraction B 65,433 mg/L, fraction C 389,339 mg/L, fraction D 262,500 mg/L, fraction E 345,300 mg/L, fraction F 1840,850 mg/L, extract 453,358 mg/L, and cisplatin 53,369 mg/L. Fraction B, which showed the best activity with an inhibitory value, was close to cisplatin as a positive control test and further purified the chemical compounds contained therein. Ten compounds from fraction B were isolated, and their molecular structures were identified based on FT-IR, NMR, and LC-MS/MS spectroscopy. The compounds were 1,7-diphenyl-6-hepten-3-one (1), cytostone (2), 1,7-diphenyl-3-heptanol (3), yakuchinone A (4), 7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-hept-4-en-3-one (5), 3,5-dimethoxy-4-acetoxycinnamyl alcohol acetate (6), oxyphyllacinol (7), 5-hydroxy-7-(4"-hydroxyphenyl)-1-phenyl-1-heptene (8), 1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-7-(4"-hydroxyphenyl)-3-heptanone (9) and 3,5-dimethoxy-4-acetoxycinnamyl alcohol (10).

Cytotoxicity assay using CCK-8 isolate 7 (oxyphyllacinol) had the best cytotoxicity activity against MDA-MD-231 breast cancer cells with an IC₅₀ value of 35.71 mg/L with an active category. Isolate 7 (oxyphyllacinol) also had the best antimetastatic activity against MDA-MB-231 breast cancer cell migration inhibition within 24 hours at concentrations of 50, 100, and 200 mg/L of 0.74; 0.36; and 0.14%. Isolates 3, 7, and 8 were statistically able to inhibit the expression of the CD44 gene in breast cancer cells MDA-MD-231 with an expression level of 0.615, respectively; 0.6151; and 0.7194. Isolates 4,5,8, and 9, based on statistics, were able to inhibit the expression of the FAK gene with an expression level of 0.1128, respectively; 0.2500; 0.1862; and 0.2403.

Keywords: *E.alba*, isolate, metastasis, gene expressions, cell migration, CD44, FAK