



**PENGARUH ASAM KLOGENAT KOPI ROBUSTA LAMPUNG  
TERHADAP EKSPRESI CYCLIN D1 DAN CASPASE 3 PADA  
CELL LINES HEP-G2**

Hening Herawati<sup>1</sup> dan Asep Sukohar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Penelitian dan Pengembangan Biologi Molekuler  
Rumah Sakit Kanker Dharmais

<sup>2</sup>Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung  
Surel: asepsukohar@gmail.com

**ABSTRACT**

Traditional medicinal plants is a natural potential which is owned by Indonesia and used as empirically therapy. Be an alternative to traditional medicine in the treatment of liver cancer patients and chlorogenic acids (CA) which have been isolated from Lampung Robusta coffee. The purpose of this study to understand the mechanism of action CA in inhibiting the growth Hep-G2 cell lines as a model of Hepatocellular Carcinoma (HCC). This experimental study was performed on 30 samples group Hep-G2 cells . Samples were divided into 10 groups , namely 5 control group who were not given CA and 5 test groups were given CA 727  $\mu$ M, 3 times repetition . Expression of caspase 3 and cyclin D1 examined by RT-PCR CFX-96 . Samples were examined at 0, 2 , 8 , 18 and 24 after exposure to CA and compared with controls. Data were tested by the method livaks and statistically with repeated measurement . The results showed an increase in the expression of caspase 3 from 0-24 hours , the highest expression of caspase 3 in group 18 hours after exposure CA with value of the expression 3.74. After 18 hours, expression of caspase 3 decreased and re-lowest in the group 24 hours after exposure . A decrease in the expression of cyclin D1 expression from 0-24 hours with the highest value at 0 hours with grades 4 and the lowest expression at 24 hours after exposure with the value of 0.37. Conclusion: CA increased caspase 3 gene expression and decreased cyclin D1 gene expression .

Keywords: caspase 3, chlorogenic acid, cyclin D1, hepatocellular cancer cell

**PENDAHULUAN**

Penggunaan berbagai obat antikanker sintesis yang berlebihan sangat berbahaya bagi kesehatan manusia seperti kebotakan, penurunan berat badan yang sangat drastis dan kulit tampak menghitam seperti terbakar. Perlu dilakukan pencarian senyawa aktif yang lebih ramah lingkungan dan meminimalkan efek samping. Asam klorogenat (AK) merupakan senyawa aktif yang mampu menghambat/mematikan sel kanker hepatoseluler. Kandungan AK dalam kopi robusta 4% (European, 2011).

Asam klorogenat dihasilkan dari kopi melalui proses ekstraksi, fraksinasi dan isolasi, salah satu khasiatnya adalah berperan sebagai antioksidan eksogen yang berperan dalam mencegah kerusakan sel serta menghambat pertumbuhan sel kanker melalui pengikatan sejumlah radikal bebas.

Peran asam klorogenat dalam menghambat pertumbuhan *Cell Lines Hep-G2* melalui reaksi oksidasi-reduksi dengan cara menangkap radikal bebas yang pada akhirnya menurunkan *Reactive oxygen spesies* (ROS). Asam klorogenat menginduksi antioksidan endogen sehingga aktifitasnya meningkat. Penurunan aktifitas ROS akan menurunkan aktifitas *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), kemudian menurunkan aktifitas cFos-cJun, kemudian menurunkan aktifitas *Cyclin-dependent Kinase* (CDK) 4 dan 6 yang pada akhirnya terjadi penghambatan fase G1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi dalam siklus sel, sehingga terjadi gangguan keseimbangan ke arah apoptosis karena terjadi supresi pada onkogen (Nakazato T, *et al.*, 2005; Yanagimoto K, *et al.*, 2004).

Ekspresi gen Cyclin D1 menggambarkan aktifitas onkogen dan ekspresi Caspase 3 menggambarkan aktifitas apoptosis.

## METODE

Penelitian ini eksperimental murni dilakukan pada 30 kelompok sampel sel Hep-G2. Kultur sel Hep-G2 menggunakan medium (DMEM/F12, Gibco) mengandung 10% *Fetal Bovine Albumin* (Sigma) dan antibiotik penisilin-streptomisin (100 mg/L), jumlah sel per well  $0,5 \times 10^4$  dan ditanam pada 96 well dengan konsentrasi DMSO yang berbeda 1%, 0,5% dan 1%. Dianalisis dengan menggunakan Elisa Reader dan konsentrasi DMSO yang digunakan 0,1% sel Hep-G2 dapat hidup 100%.

Sampel dibagi dalam 10 kelompok, yaitu 5 kelompok kontrol yang tidak diberi AK dan 5 kelompok uji yang diberi AK 727  $\mu\text{M}$ , dilakukan 3 kali pengulangan. Intervensi asam klorogenat dilakukan pada 48 jam setelah dilakukan kultur sel Hep-G2 dan konfluen 60-80%. Dosis  $\text{IC}_{50}$  didapat dengan melakukan uji sitoksisitas AK dari 400, 500, 600, 700 dan 800  $\mu\text{M}$  dan didapat nilai  $\text{IC}_{50}$  727  $\mu\text{M}$ .

Isolasi total RNA menggunakan dengan protokol Exiqon, menggunakan miRCURY™ RNA Isolation Kit– Kode produk 300110 dari Exiqon. Pembuatan cDNA menggunakan Universal cDNA synthesis kit kode produk 203300 dari Exiqon. Primer



Cyclin D1 (nomor kode produk FB-6400-05) didapat dari BioRad melalui PT.Scienwerke. *Forward* 5'-GCA TGT TCG TGG CCT CTA AGA-3' dan *Reverse* 5'-CGG TGT AGA TGC ACA GCT TCT C-3'.

Primer Caspase 3 (nomor kode produk BioRad FB-6400-05) didapat dari BioRad melalui PT.Scienwerke. Primer F 5'AGA ACT GGA CTG TGG CAT TGA G 3' dan Revers: 5' ATG TGC TGT GAC TGC TTG TAG ATG 3'

Sintesis cDNA dilakukan dalam volume total 20  $\mu$ l yang terdiri dari: a) 5x *Reaction buffer* 4  $\mu$ l, *Nuclease-free water* 9  $\mu$ l; b) Enzyme mix 2  $\mu$ l; c) *Synthetic spike in* dengan H<sub>2</sub>O 1  $\mu$ l; d) *Template* total RNA (5 ng/ $\mu$ l) 4  $\mu$ l. Dilakukan inkubasi selama 60 menit pada suhu 42°C, dilanjutkan dengan *reverse transcriptase* selama 5 menit pada suhu 95°C, kemudian segera dilakukan pendinginan pada 4°C dan disimpan pada suhu 4°C atau dalam *freezer*.

RT-PCR amplifikasi dilakukan dengan volume total 10  $\mu$ l yang terdiri dari: a) *Sso Fast EvaGreen supermix* 5  $\mu$ l; b) Primer (*forward and reverse*) 2  $\mu$ l; c) cDNA template 2  $\mu$ l, dan d) H<sub>2</sub>O 1  $\mu$ l. Dilakukan denaturasi 94°C selama 3 menit, siklus temperatur sudah ditentukan. Setiap siklus terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, suhu *annealing* selama 30 detik. Total setiap siklus terdiri dari 40 siklus. Optimasi suhu dilakukan dengan cara melihat lampiran kode produk BioRad ditambah kenaikan suhu 3°C dan dikurangi 3°C kemudian dijalankan dengan *software* CFX-96. Gradien suhu *annealing* Cyclin D1 antara 58<sup>0</sup>C- 67<sup>0</sup>C dan suhu optimal untuk *annealing* Cyclin D1:59,8<sup>0</sup>C. Gradien suhu *annealing* Caspase-3 antara 59<sup>0</sup>C- 65<sup>0</sup>C, suhu optimal untuk *annealing* Caspase-3: 60,2<sup>0</sup>C.

Ekspresi caspase 3 dan cyclin D1 diperiksa dengan RT-PCR CFX-96. Sampel diperiksa pada jam ke 0, 2, 8, 18 dan 24 setelah terpapar AK, dibandingkan dengan kontrol. Data diuji dengan metode livaks dan secara statistik dengan *repeated measurement*. Analisis ekspresi gen Cyclin D1 dan Caspase 3 menggunakan metode Livak dengan rumus:  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Normalisasi dilakukan dengan mengurangkan masing-masing nilai Cq target sebelum dan sesudah pemaparan (berdasarkan 5 perbedaan waktu) dengan masing-masing nilai Cq reference (berdasarkan 5 perbedaan waktu), sehingga didapat nilai  $\Delta Cq$ . Nilai  $\Delta\Delta Cq$ , ditentukan dengan mengurangkan nilai  $\Delta Cq$  target terhadap  $\Delta Cq$  reference.

Hasil analisis regresi linier berupa prosentasi sel yang hidup



(viability cell) dengan persamaan  $Y=189,81\pm 193,67 X$  kadar asam klorogenat.

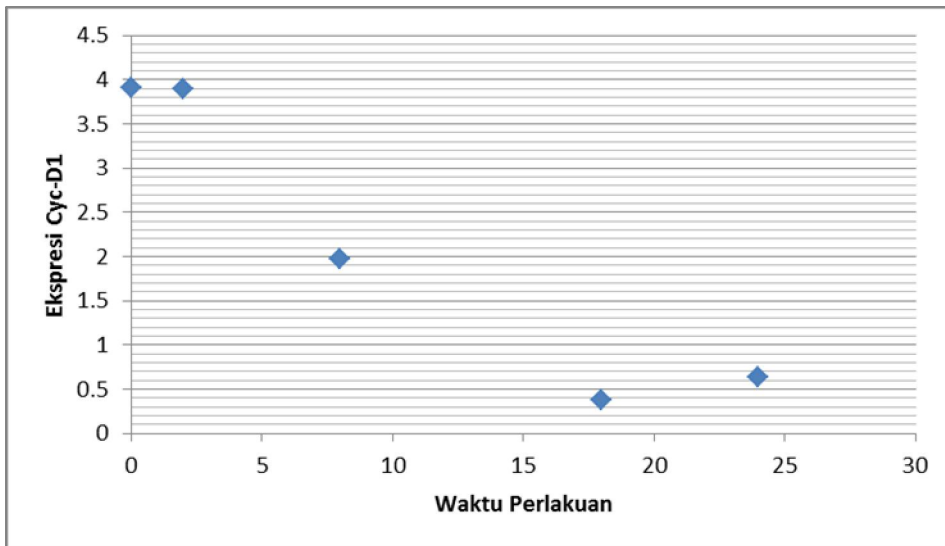
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan dosis  $IC_{50}$  dimulai dari dosis 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 dan 0,8 mM, dikonversi ke mikro molaritas ( $\mu M$ ) maka dikalikan dengan 1000 dan dosis  $IC_{50}$  AK didapat pada konsentrasi 727  $\mu M$ .

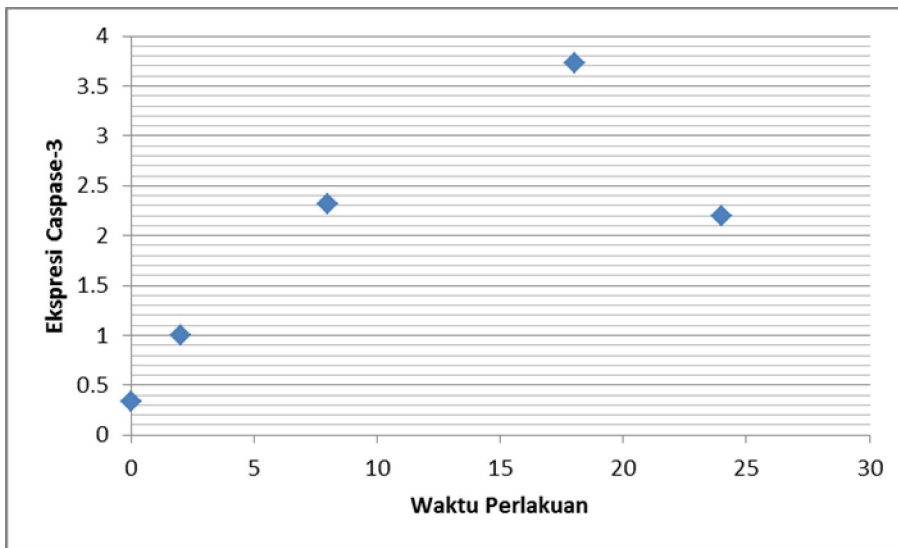
Perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan suhu optimal *annealing* Cyclin D1. Metoda yang digunakan dengan elektroforesis. Setiap selesai melakukan gradien suhu dengan menggunakan RT-PCR dilanjutkan dengan elektroforesis, gradien suhu *annealing* Cyclin D1 antara 58—67°C dan suhu optimal untuk *annealing* Cyclin D1: 59,8°C. Begitupun terhadap Caspase 3 gradien suhu *annealing* Caspase 3 antara 59°C- 65°C dan suhu optimal untuk *annealing* Caspase 3: 60,2 °C.

Untuk menganalisis linearitas ekspresi gen Cyclin D1 dan Caspase 3, dilakukan analisis regresi linier terhadap Cyclin D1 dan Caspase 3 yaitu  $Y= 3.192 - 0.1 X$  dan  $Y= 0.505 + 0.146 X$ .

Analisis ekspresi gen miRNA 146 A menggunakan metode Livak dengan rumus:  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Normalisasi dilakukan dengan mengurangkan masing-masing nilai Cq target sebelum dan sesudah pemaparan (berdasarkan 5 perbedaan waktu) dengan masing-masing nilai Cq *reference* (berdasarkan 5 perbedaan waktu), sehingga didapat nilai  $\Delta Cq$ . Nilai  $\Delta\Delta Cq$ , ditentukan dengan mengurangkan nilai  $\Delta Cq$  target terhadap  $\Delta Cq$  *reference*. Ekspresi gen Cyclin D1 yang terpapar AK tampak pada gambar 1 dan ekspresi Caspase 3 tampak pada Gambar 2.



Gambar 1 Grafik Ekspresi mRNA *Cyclin D1* berdasarkan waktu



Gambar 2 Grafik Ekspresi mRNA *Caspase-3* berdasarkan waktu

### Pembahasan

Dalam keadaan normal, aktifitas biologi molekuler terjadi keseimbangan antara gen yang bertindak sebagai supresi yang mengakibatkan apoptosis dan onkogen yang dapat mengakibatkan proliferasi. Intervensi asam klorogenat dapat menekan fungsi gen onkogen dan sekaligus menginduksi apoptosis. Keseimbangan gen supresi diwakili oleh ekspresi caspase 3 dan gen onkogen diwakili oleh ekspresi cyclin D1. Gen supresi akan

mengakibatkan apoptosis sehingga aktifitas caspase 3 meningkat dan sebaliknya aktifitas cyclin D 1 menurun sehingga aktifitasnya berkurang terlihat pada gambar 1 dan 2 (Paynter, *et al.*, 2006).

Penurunan aktifitas ROS akan menurunkan aktifitas MAPK, kemudian menurunkan aktifitas cFos dan cJun. Aktifitas cFos dan cJun menurunkan aktifitas CDK 4 dan 6 yang pada akhirnya terjadi penghambatan fase G1 yang bertanggung jawab dalam proliferasi dalam siklus sel, sehingga terjadi gangguan keseimbangan serta dominan ke arah apoptosis karena terjadi supresi pada onkogen (Guller M, *et al.* 2008).

Proses fosforilisasi Cyclin D1 akibat intervensi asam klorogenat akan mengakibatkan: aktifitas Cyclin D1 menurun dan proses proliferasi terhambat/berhenti (karena gen Retinablastoma aktif).

Aktifitas gen cyclin D1 dan caspase-3 diukur berdasarkan ekspresi masing-masing gen dengan metode Livak dengan prinsip dasar relatifitas dan rumus  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Hasil analisis sesuai dengan gambar 4 menggambarkan asam klorogenat mampu mempengaruhi aktifitas mRNA Cyclin D1 dengan membandingkan antar waktu pada 0, 2, 8, 18, 24 jam antara sebelum dan sesudah perlakuan. Asam klorogenat sangat berpengaruh pada 18 jam setelah perlakuan dengan ekspresi Cyclin D1 pada angka 0,37, setelah 18 jam aktifitas Cyclin D1 meningkat kembali dengan diekspresikan pada angka 0,64. Data berdistribusi normal,  $R=0.605$  yang merupakan simbol dari nilai koefisien korelasi, dan persamaan regresi linear  $Y= 3.192 - 0.1 X$ .

Keseimbangan antara gen supresi (Caspase 3) dan onkogen (Cyclin D1) diaktifkan melalui reaksi kimia intraseluler berupa fosforilisasi. Kerusakan mitokondria yang diakibatkan ROS akan memicu sitokrom C dan dilanjutkan dengan serangkaian kaskade dan diakhiri dengan meningkatnya aktivasi Caspase 3 sebagai eksekutor apoptosis. Proses apoptosis di induksi dengan pemberian asam klorogenat sehingga ekspresi Caspase 3 meningkat (Zhang J, *et al.*, 2008).

Jalur kematian sel melalui apoptosis ini dibagi menjadi dua yaitu pertama melibatkan interaksi antara *dead receptor* dipermukaan sel dengan ligan (*extrinsic pathway*) dan ke-2 melalui jalur yang melibatkan mitokondria (*intrinsic pathway*). Ke-2 jalur apoptosis ini melibatkan sinyal sel protein melalui jalur *cystein aspartat-specific protease* (Caspase) yang melibatkan protein inisiator caspase yaitu caspase-8 dan caspase-9.

Sedangkan protein eksekutor yang terlihat dalam proses apoptosis adalah caspase-3, yang teraktifasi oleh caspase-8 dan caspase-9 (Rakshit S, *et al.*, 2010)..

Hasil analisis sesuai dengan gambar 2 menggambarkan asam klorogenat mampu mempengaruhi aktifitas mRNA Caspase 3 dengan membandingkan antar waktu pada 0, 2, 8, 18, 24 jam antara sebelum dan sesudah perlakuan dan didapatkan data bahwa asam klorogenat sangat berpengaruh pada 18 jam setelah perlakuan dengan ekspresi Caspase 3 pada angka 3,74 dan setelah 18 jam aktifitas Caspase 3 menurun. Distribusi data normal,  $R=0.932$  yang merupakan simbol dari nilai koefisien korelasi, dan persamaan regresi linear  $Y= 0.505 + 0.146 X$ .

## KESIMPULAN

Asam klorogenat menghambat pertumbuhan sel kanker Hep-G2 dengan menurunnya ekspresi Cyclin D1 dan meningkatnya ekspresi Caspase 3.

## DAFTAR PUSTAKA

- European. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coffee, including chlorogenic acids from coffee, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage, maintenance of normal blood glucose concentrations, and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight. Parma: Italy. EFSA Journal. 9(4):1–23
- Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, Kinjo K, Yamada T, Hozumi N, Ikeda Y, Kizaki M. 2005. Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *The hematology Journal*. 90(3): 317–25.
- Paynter, Nina P, Hsin-Chieh Y, Sari V, Maria I S, Gerardo H, Aaron R F, Frederick L. Brancati and W. H. Linda K. 2006. Coffee and Sweetened Beverage Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus." (HTML). *American Journal of Epidemiology*. 164 (11): 1075–84. Oxford Journals.
- Rakshit S, Mandal L, Pal BC, Bagchi J, Biswas N, Chaudhuri J, *et al.* 2010. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells. 80:1662–75.
- Yanagimoto K, Ochi H, Lee KG, Shibamoto T. 2004. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *J Agric Food Chem*. 52(3):592–6.



- Zhang J, Melton LD, Adaim A, Skinner MA. 2008. Cytoprotective effects of polyphenolics on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death In SH-SY5Y cells in relation to their antioxidant activities. *Eur Food Res Technol.* 228:123–31.
- Guller M, Abed KT, Legrand A, Michel L, Mauviel A, Bernuau D, *et al.* 2008. c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear cyclin D1. *World J Gastroenterol.* 14(41): 6339-46.