

RESPONS SEL EPITEL USUS (CMT-93) TERHADAP NUTRASETIKAL GALOHGOR

Response of Intestinal Epithelial Cell Line on Galohgor Nutraceutical

Katrin Roosita¹, Rimbawan¹, Ita Djuwita², M. Rizal Damanik¹, dan Clara M. Kusharto¹

¹Departemen Gizi Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: kroosita@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan membandingkan pengaruh nutrasetikal galohgor dalam bentuk serbuk (GS) dan ekstrak (GE) terhadap proliferasi, morfologi, dan ekspresi gen *Aldh1a2* pada sel epitel usus (CMT-93). Galohgor serbuk (GS) dibuat dengan menghancurkan semua bahan dan dikeringkan menggunakan *drum-dryer* sedangkan GE dibuat dengan mengeringkan semua bahan dengan oven, digiling, dan dimaserasi dengan etanol selama 3x24 jam. Perlakuan didasarkan pada konsentrasi akhir β -karoten yang berasal dari GS dan GE masing-masing sebesar 0,5; 1,5; dan 5,0 μ M dalam larutan medium *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) yang dilengkapi serum (10%). Analisis proliferasi menggunakan asai 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dan ekspresi gen dianalisis dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa GE pada konsentrasi tinggi (5,0 μ M) secara signifikan ($P < 0,05$) dapat menekan proliferasi dan memengaruhi morfologi sel CMT-93. Beta-karoten dalam GE dan GS memengaruhi ekspresi gen *Aldh1a2* pada sel epitel usus CMT-93.

Kata kunci: nutrasetikal galohgor, *Aldh1a2*, CMT-93, proliferasi

ABSTRACT

The aim this study was to compare the effects of powder (PG) and extracted (EG) galohgor nutraceuticals on proliferation, morphology, and gene expression of *Aldh1a2* of intestinal epithelial cell line (CMT93). Powder galohgor was made by crushing all of galohgor nutraceuticals and dried by drum dryer, while EG was made by drying in the oven, drilling and ethanol maseration 3x24 hours. Proliferation and gene expression were respectively analyzed with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) or reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). At high concentration (5.0 μ M) extracted nutraceutical Galohgor (EG) significantly decreased proliferation and alter the morphology of CMT-93 cells. β -carotene influenced *Aldh1a2* gene expression of CMT-93 cell line.

Key words: galohgor nutraceutical, *Aldh1a2*, CMT-93, proliferation

PENDAHULUAN

Pangan yang memiliki khasiat untuk kesehatan, baik untuk pencegahan maupun pengobatan disebut sebagai nutrasetikal (Kalra, 2003; Syamsudin 2013). Salah satu nutrasetikal yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat Sunda secara turun-temurun untuk meningkatkan kesehatan dan produksi air susu ibu (ASI), khususnya pada masa nifas (*postpartum*) adalah galohgor. Nutrasetikal galohgor terbuat dari 56 jenis tanaman. Zat gizi yang cukup banyak terdapat dalam nutrasetikal galohgor adalah β -karoten (Roosita *et al.*, 2003; Pratiwi 2010).

Penelitian tentang β -karoten terus berkembang hingga tingkat seluler. Metabolisme β -karoten di berbagai sel tubuh usus halus, ginjal, retina, hati, dan jaringan lemak menghasilkan retinal dan/atau retinol (Redmon *et al.*, 2001; Bhatti *et al.*, 2003; Gropper *et al.*, 2009). Lebih lanjut retinal dimetabolisme menjadi asam retinoat oleh serangkaian enzim aldehid dehidrogenase (*Aldh*) hasil ekspresi kelompok gen *ALDH* (Jackson *et al.*, 2011).

Hasil survei menunjukkan bahwa galohgor aman untuk dikonsumsi (Dahlianti *et al.*, 2005). Uji toksisitas akut pada hewan coba menunjukkan bahwa galohgor bersifat aman dan tidak toksik jika dikonsumsi sesuai anjuran (Wicaksono 2010). Beta-karoten pada sel epitel usus (CMT-93) pada konsentrasi suprafisiologis (5,0

μ M) dapat menekan proliferasi, memengaruhi morfologi, dan menginduksi ekspresi gen *Aldh1a2* (Roosita *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan membandingkan pengaruh serbuk galohgor (GS) dan ekstrak galohgor (GE) terhadap proliferasi dan viabilitas sel usus, perubahan morfologi dan ekspresi gen *Aldh1a2* pada sel epitel usus (CMT-93). Penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan pengaruh perbedaan proses pembuatan simplisia terhadap proliferasi dan viabilitas, perubahan morfologi serta ekspresi gen pada sel usus mamalia termasuk manusia.

MATERI DAN METODE

Pembuatan GS dan GE

Nutrasetikal galohgor dibuat dari 56 jenis tanaman yang termasuk dalam kelompok sereal, kacang-kacangan, daun, batang, dan rimpang. Galohgor serbuk (GS) dibuat dengan menghancurkan semua bahan dan dikeringkan dengan menggunakan *drum-dryer*. Galohgor ekstrak (GE) dibuat dengan mengeringkan semua bahan dengan oven, digiling, dan dimaserasi dengan etanol (70%) selama 24 jam sebanyak 3 kali.

Kultur Sel Epitel Usus (CMT-93)

Medium kultur sel terdiri atas *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco) yang ditambah dengan penisilin dan streptomisin. Serum yang

digunakan untuk kedua jenis sel adalah adalah *heat-inactivated fetal bovine serum* (FBS).

Analisis Proliferasi dan Ekspresi Gen *Aldh1a2*

Kit 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Roche) digunakan untuk analisis proliferasi dan viabilitas sel. Isolasi *ribonucleic acid* (RNA) dilakukan sesuai prosedur yang ditetapkan kit Rneasy (Qiagen) dan dilanjutkan dengan analisis *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) sesuai petunjuk kit Takara. Hasilnya kemudian dimunculkan dengan gel elektroforesis.

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan ditentukan dengan perbedaan konsentrasi akhir β -karoten yang berasal dari GS dan GE dalam larutan medium, yaitu sebesar 0,5; 1,5; dan 5,0 μ M. Jumlah ulangan untuk parameter ekspresi gen dan diferensiasi sel berjumlah 3 atau 4 ulangan, sedangkan untuk proliferasi dan viabilitas sel masing-masing 6 ulangan.

Analisis Data

Semua data kualitatif disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif diuji dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) dan uji lanjut Duncan.

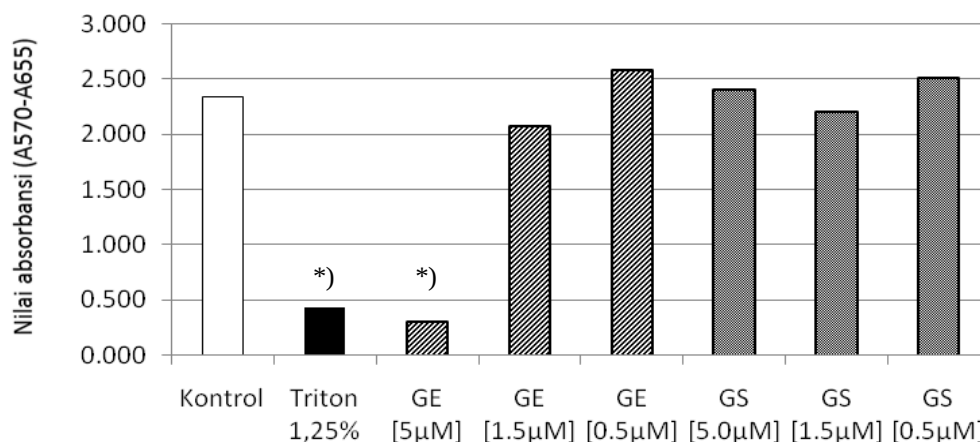
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan pada konsentrasi suprafisiologis GE (5,0 μ M) dan triton X-114 (1,25%) menurunkan proliferasi sel epitel usus (CMT-93) secara signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Sebaliknya perlakuan, GS pada konsentrasi suprafisiologis tidak menyebabkan perbedaan proliferasi dan viabilitas sel (Gambar 1). Triton X-114 digunakan sebagai kontrol negatif karena dapat menekan proliferasi dan viabilitas sel. Malen *et al.* (2010) menyatakan bahwa triton X-114 memiliki sifat sebagai deterjen yang dapat

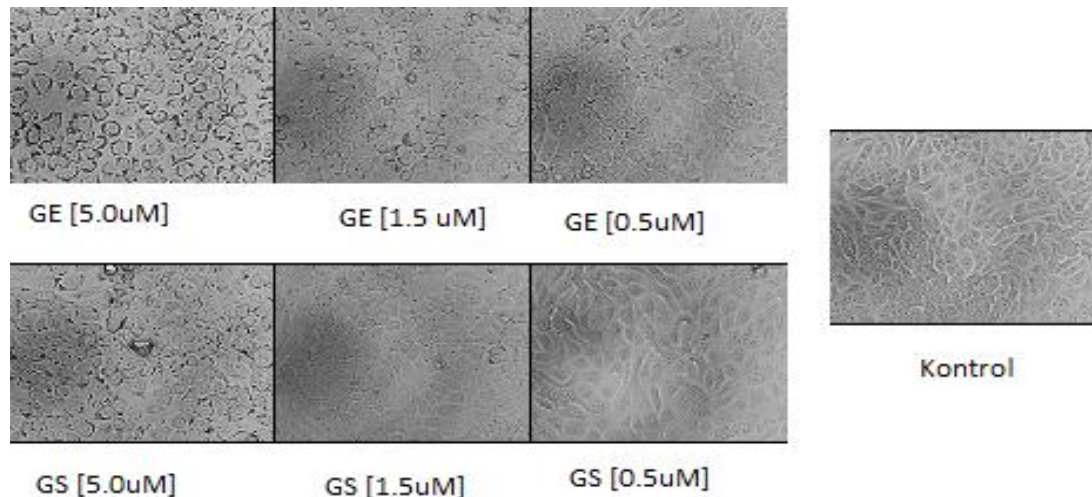
menyebabkan kerusakan struktur lipoprotein dan fosfolipid pada membran sel. Selain menunjukkan tingkat proliferasi, asai MTT juga dapat digunakan untuk menguji tingkat toksisitas suatu bahan. Semakin banyak sel yang mati, atau semakin rendah nilai absorbansi, berarti semakin toksik suatu bahan (Roosita *et al.*, 2013). Serbuk galahgor tingkat toksiknya lebih rendah jika dibandingkan GE yang menggunakan etanol sebagai pelarut dalam proses ekstraksi. Hal ini ditunjukkan dengan hasil bahwa secara signifikan konsentrasi suprafisiologis GE dapat menekan proliferasi, sedangkan GS tidak menekan proliferasi. Etanol yang digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan GE diduga telah menarik lebih banyak senyawa bersifat nonpolar yang diduga dalam jumlah berlebih bersifat toksik.

Beta-karoten dalam GE memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan GS pada saat pembuatan larutan stok. Hasil ini sesuai dengan laporan Roosita *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa β -karoten dengan konsentrasi suprafisiologis dapat menekan proliferasi pada sel epitel usus (CMT-93). Hasil penelitian Wojcik *et al.* (2008) juga menunjukkan hasil yang sesuai dengan penelitian ini dan hasil tersebut menyimpulkan bahwa β -karoten pada konsentrasi tinggi (5,0 μ M) dapat menekan proliferasi pada sel oval secara *in vitro*.

Sel yang diberi GS pada konsentrasi fisiologis (0,5 μ M) menunjukkan perkembangan struktur sel tidak berbeda dengan kontrol namun tampak ukuran sel menjadi lebih besar dan lebih kompak. Pada perlakuan dengan GE, pada konsentrasi 1,5 dan 5,0 μ M terlihat banyak sel yang mengalami degenerasi dan piknotik (Gambar 2). Perubahan morfologis terlihat pada morfologi sel CMT-93 subkonfluen yang diberi perlakuan GE dan GS pada konsentrasi tinggi (5,0 dan 1,5 μ M). Sel-sel tersebut mengalami perubahan ukuran, beberapa mulai menunjukkan degenerasi dan piknotik. Perubahan struktur morfologis pada sel CMT-93 diduga terjadi karena pemberian GE yang mengandung β -karoten lebih tinggi dari konsentrasi fisiologisnya.



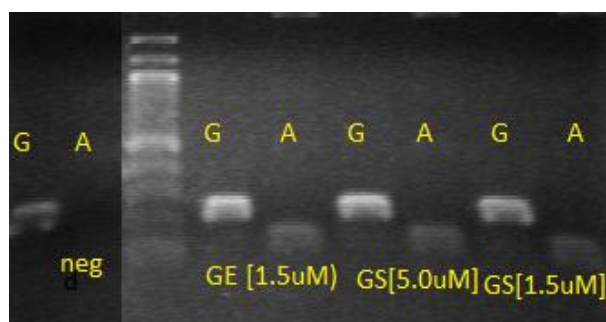
Gambar 1. Nilai absorbansi hasil asai (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) pada kontrol negatif (triton X-114 1,25%) perlakuan galahgor ekstrak (GE), galahgor serbuk (GS) dengan berbagai dosis (0,5; 1,5; dan 5,0 μ M) dibandingkan terhadap kontrol (*= Menunjukkan hasil yang berbeda nyata, $P < 0,05$)



Gambar 2. Morfologi sel CMT-93 dalam medium kontrol, perlakuan galohgor ekstrak (GE), galohgor serbuk (GS) dengan berbagai dosis (0,5; 1,5; dan 5,0 μ M) dibandingkan terhadap kontrol

Hasil ini sesuai dengan penelitian Roosita *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi suprafisiologis (5,0 μ M) β -karoten dapat memengaruhi morfologi sel epitel CMT-93. Koshy *et al.* (1996) menjelaskan bahwa perubahan morfologi pada epitel usus manusia berkorelasi dengan adanya perubahan mikrofilamen aktin dan volume sel.

Hasil analisis RT-PCR menunjukkan bahwa GE dan GS memengaruhi ekspresi gen Aldh1a2 oleh sel epitel usus (CMT-93) (Gambar 3). Hal ini diduga karena adanya β -karoten dalam GE dan GS. Gen *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gadph) terekspresi pada sel semua yang ditumbuhkan dalam medium kontrol DMEM maupun perlakuan. Hal ini karena Gapdh merupakan gen yang mengode enzim yang berperan dalam mempertahankan kondisi homeostatis pada sel (*housekeeping enzyme*).



Gambar 3. Ekspresi gen Gapdh (G) dan Aldh1a2 (A) pada sel CMT-93, yang ditumbuhkan dalam medium kontrol negatif (neg) dan perlakuan ekstrak galohgor (GE 1,5 μ M), serbuk galohgor (GS 5,0 μ M dan GS 1,5 μ M).

Galohgor ekstrak dan GS memengaruhi ekspresi gen Aldh1a2 oleh sel epitel usus (CMT-93) (Gambar 3). Hal ini diduga karena adanya β -karoten dalam GE dan GS. Hasil ini sesuai dengan laporan Roosita *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa β -karoten dapat meningkatkan ekspresi gen Aldh1a2 pada sel epitel usus (CMT-93).

Duester (2000) dan Jackson *et al.* (2011) menjelaskan peranan Aldh1a2 dalam metabolisme β -karoten untuk diubah menjadi asam retinoat. Sebelumnya, proses tersebut didahului oleh kerja enzim β -karoten-15,15-dioksigenase yang mengonversi β -karoten menjadi retinal. Selanjutnya perubahan retinal menjadi asam retinoat ini memerlukan bantuan serangkaian enzim aldehid dehidrogenase yang salah satunya dikode oleh Aldh1a2.

KESIMPULAN

Galohgor ekstrak pada konsentrasi tinggi (5,0 μ M) dapat menekan proliferasi dan memengaruhi morfologi sel epitel usus (CMT-93). Beta-karoten dalam GE dan GS memengaruhi ekspresi gen Aldh1a2 pada sel epitel usus CMT-93.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Fumito Tani, *Laboratory of Food and Enviromental Science, Division Food Science and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Japan* atas donasi CMT-93, fasilitas laboratorium dan bahan kimia sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhatti, R., S. Yu, A. Boulanger, R.N. Fariss, Y. Guo, S.L. Bernstein, S. Gentleman, dan M.T. Redmond. 2003. Expression of beta carotene 15,15monooxygenase in retina and RPE-choroid. *IOVS*. 44(1):44-49.
- Dahlanti, R., A. Nasoetion, dan K. Roosita. 2005. Keragaan perawatan kesehatan masa nifas, pola konsumsi jamu tradisional, dan pengaruhnya pada ibu nifas di Desa Sukajadi, Kecamatan Tamansari, Bogor. *Media Gizi dan Keluarga*. 29(2):32-37.
- Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem*. 267:4315-4324.
- Gropper, S.S., J.L. Smith, dan J.L. Groff. 2009. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**. 5th ed. Wadsworth, Cengage Learning, Belmont, USA.

- Jackson, B., C. Brocker, D.C. Thompson, W. Black, K.Vasiliou, D.W. Nebert, and V. Vasiliou. 2011. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. **Hum. Gen.** 5(4):283-303.
- Kalra, E.K. 2003. Nutraceutical-definition and introduction. **AAPS. Pharm. Sci.** 5(3):27-28.
- Koshy, S.S., M.H. Montrose, and C.L. Sears. 1996. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.** 64(12):5022-5028.
- Målen, H., S. Pathak, T. Sjøteland, and G. de Souza. 2010. Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **BMC. Microbiol.** 10(132):1-11.
- Pratiwi, A. 2010. Bioavailabilitas Mineral secara *in vitro* dan Kadar Beta-karoten Jamu Galohgor (Produk Jamu untuk Kesehatan Ibu Nifas dan Menyusui dari Desa Sukajadi, Kecamatan Tamansari, Kabupaten Bogor. **Skripsi.** Departemen Gizi Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Redmond, T.M., S. Gentleman, T. Duncan, S. Yu, B. Wiggert, E. Gantt, and F.X. Cunningham, Jr. 2001. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian b-Carotene 15,15*-dioxygenase. **JBC.** 276(9):6560-6565.
- Roosita, K., C.M. Kurharto, N. Kusumorini, and W. Manalu. 2003. The Effect of Traditional Herbs Medicine "Galohgor" on Uterus Involution and Milk Production of Rats (*Rattus* sp). **Prosiding International Symposium on Biomedicines: Biodiversity on Traditional Biomedicines for Human Health and Welfare.** Bogor Agricultural University. Bogor Indonesia:338-341.
- Roosita, K., C.M. Kusharto, M.Sekiyama, Y. Fachrurrozi, and R. Ohtsuka. 2008. Medicinal plants used by the villagers of a sundanese community in West Java, Indonesia. **JEP.** 115:72-81.
- Roosita, K., R.S. Martopuro, I. Djuwita, M.R. Damanik, C.M. Kusharto, and F. Tani. 2013. Biological response of epithelial cells line (CMT-93) induced by β -carotene. **PJN.** 12(7):615-619.
- Syamsudin. 2013. **Nutrasetikal.** Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Wicaksono, M.A. 2010. Evaluasi Fungsi Hati dan Ginjal Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley pada Pemberian Jamu Galohgor dengan Dosis Bertingkat. **Tesis.** Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wojcik, M., N. Bobowick, and F. Martelli. 2008. Effect of carotenoid on in vitro proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic liver injuries in rats. **J. Phys. Pharma.** 59(2):202-213.