

Potensi Ekstrak Metanol Tunikat Sebagai Agen Perlindungan Sel

Nihayah, M.^{1*}, Nur Shafurah, M.S.¹, Rajab, N.F.¹,
Lee, J.N.² & Kee Alfian, A.A.³

¹Jabatan Sains Bioperubatan, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu

²Pusat Penyelidikan Ekosistem Marin (EKOMAR), Fakulti Sains dan Teknologi

³Pusat Pengajian Sains Sekitaran & Sumber Alam, Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia.

Pengenalan

Tunikat merujuk kepada mana-mana haiwan yang berada di dalam filum Chordata dan subfilum Tunicata (Urochordata). Tunikat merupakan haiwan marin yang kecil tetapi ia boleh dijumpai dengan sangat meluas di dalam laut. Terdapat banyak kajian yang telah dijalankan terhadap spesies haiwan laut ini. Dalam kajian terdahulu yang dijalankan ke atas *Diplosoma virens* mendapati ekstrak asetonna yang mengandungi bahan bioaktif, mempunyai kesan sitotoksik terhadap sel kanser kolorektal manusia (HCT116) dan tindakan ini bersandar kepada kepekatan ekstrak yang digunakan (Ogi et al. 2008). Manakala kajian yang dilakukan ke atas *Didemnum psammatoedes* mendapati ekstrak metanolnya memberikan kesan antileukemik ke atas sel leukemia manusia (HL-60) (Takeara et al. 2008). Tunikat juga merupakan sumber terbaru dalam penghasilan antibiotik (Concepcion et al. 1994). Kajian ini dilakukan untuk mengenal pasti potensi ekstrak metanol tunikat sebagai agen perlindungan sel terutamanya terhadap sel hepatoblastoma.

Bahan dan Kaedah

Proses Pengekstrakan

Tunikat yang diperolehi dari kawasan perairan sekitar Mersing, Johor diekstrak menggunakan pelarut metanol secara pengekstrakan sejuk (*cold extraction*) (Kaou et al. 2008). Tunikat direndam di dalam 200 mL larutan metanol (99.8%) dan dibiarkan pada suhu bilik selama dua hari. Selepas dua hari, ekstrak diasingkan daripada pelarut dengan menggunakan mesin rotawap (Eyela N-1000-WD).

Sel Selanjar

Terdapat dua jenis sel selanjar yang digunakan iaitu sel selanjar HepG2 (sel hepatoblastoma) dan sel hepar Chang (sel hepar normal) diperolehi daripada *American Type Culture Collection* (ATCC). Sel hepar Chang dikulturkan dalam media RPMI-1640 manakala sel HepG2 dikulturkan dalam media DMEM. Kedua-dua media dicampurkan dengan 10% FBS (foetal bovine serum), 100 IU/mL peninsilin serta 5 mg/mL streptomycin untuk menjadikannya media pertumbuhan lengkap. Kesemua sel dikulturkan di Makmal Bioserasi dan Toksikologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Analisis FRAP (Benzie & Strain 1996)

Reagen FRAP disediakan dengan menambahkan penimbal asetat, TPTZ, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan air suling pada nisbah 10:1:1:1.2. Sebanyak 25 μL ekstrak tunikat pada kepekatan yang berbeza dimasukkan ke dalam plat 96-telaga. Kemudian, sebanyak 175 μL reagen FRAP ditambahkan ke dalam setiap telaga. Nilai penyerapan (OD) dibaca selepas 4 minit pada panjang gelombang 590 nm. Graf piawai diplotkan daripada tindakan reagen FRAP dengan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ manakala kawalan positif yang digunakan ialah Vitamin C. Langkah ini diulang dengan menggunakan sel selanjar yang dirawat dengan ekstrak selama 2 jam.

Asai MTT

Asai MTT (Mosmann 1983) dijalankan untuk melihat kesan sitotoksik ekstrak metanol tunikat terhadap sel HepG2 dan sel hepar Chang. Sel yang telah dikulturkan di dalam media pertumbuhan lengkap dikira menggunakan hemositometer. Kepekatan sel yang optimum bagi asai MTT adalah 5×10^4 sel/mL. Sebanyak 100 μL sel dipipet ke dalam plat mikrotiter 96-telaga dan diinkubasi semalaman. Seterusnya, media dipipet keluar dan 200 μL ekstrak dipipet ke dalam plat dengan kepekatan tertinggi yang digunakan adalah 1 mg/mL. Plat kemudian dieram selama 24 jam di dalam inkubator bersuhu 37°C dengan 5% CO_2 . Selepas 24 jam inkubasi, 20 μL larutan garam MTT ditambahkan ke dalam setiap telaga dan dieram semula selama 4 jam. Selepas 4 jam, sebanyak 150 μL supernatan dikeluarkan dan digantikan dengan 150 μL larutan DMSO untuk melarutkan Kristal formazan yang terbentuk. Plat dieram selama 15 minit untuk melarutkan keseluruhan kristal formazan. Keamatan warna yang terhasil diukur sebagai nilai penyerapan (OD) pada panjang gelombang 570 nm.

Asai Komet Beralkali

Asai Komet beralkali (Singh et al. 1988) dijalankan untuk melihat kesan genotoksik ekstrak terhadap kedua-dua jenis sel selanjar. Sebanyak 2 mL sel pada kepekatan 5×10^4 sel/mL dimasukkan ke dalam setiap telaga pada plat 6-telaga. Plat kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 37°C dan 5% CO_2 . Selepas semalaman, media dipipet keluar dan ekstrak metanol tunikat ditambah ke dalam sel dan dieram selama 24 jam. Kepekatan ekstrak yang digunakan untuk asai Komet diperolehi daripada nilai IC_{25} asai MTT. Kawalan positif yang digunakan adalah 50 μM hidrogen peroksida. Selepas

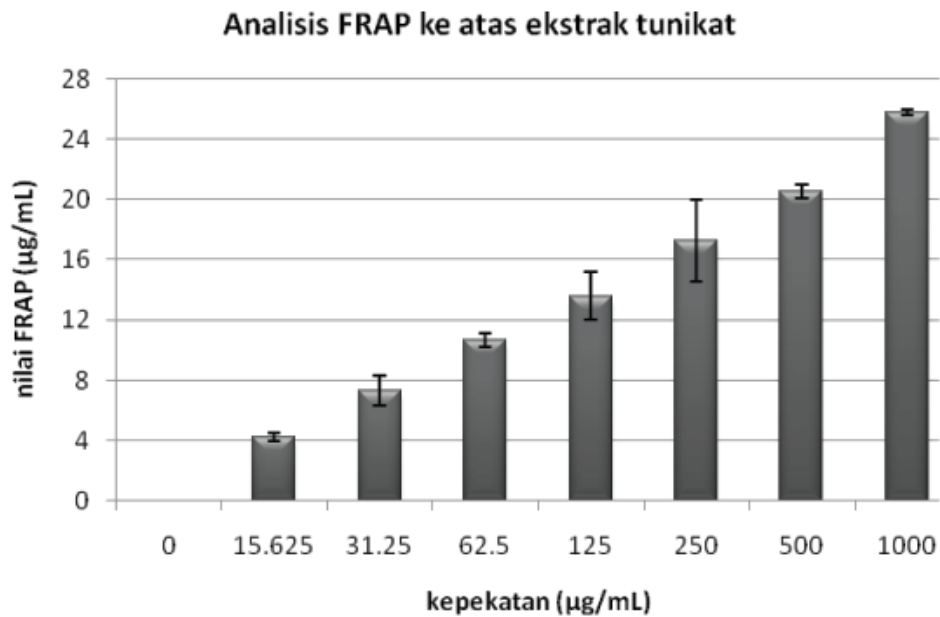
24 jam rawatan, sel dicuci dengan PBS dan dipindahkan ke dalam tiga tiub endof yang berbeza bagi setiap telaga. Sel diempar pada 2500 rpm selama 5 minit. Supernatan dibuang manakala pelet yang diperolehi dicuci dengan PBS dan diempar sekali lagi. Sementara itu, 100 µL gel agaros bertakat lebur normal (NMA) dipipetkan ke atas slaid berfros. Setelah dibiarkan mengeras di atas ais, 10 µL suspensi sel dicampurkan dengan 80 µL gel agaros bertakat lebur rendah (LMA) dan dipipetkan ke atas slaid. Selepas gel mengeras, slaid dimasukkan ke dalam *coplin jar* yang mengandungi 30 mL penimbali lisis (2.5 M NaCl, 100mM EDTA dan 10 mM Tris). Sebanyak 300 µL Triton-X ditambahkan ke dalam *coplin jar* sebelum digunakan. Slaid dibiarkan terendam sekurang-kurangnya selama satu jam pada suhu 4°C. Selepas itu, slaid dipindahkan ke dalam unit elektroforesis yang mengandungi penimbali elektroforesis pada pH beralkali (pH > 13). Slaid dibiarkan terendam selama 20 minit untuk proses relaksasi DNA. Selepas 20 minit, proses elektroforesis dijalankan pada 25V, 300 mA selama 20 minit. Kemudian, slaid dicuci dengan larutan penimbali neutralisasi sebanyak tiga kali selama 5 minit. Slaid diwarnakan dengan 50 µM etidium bromida dan diperhatikan di bawah mikroskop fluoresen Leica DM 2500. Analisis komet dijalankan menggunakan perisian *Comet Score* untuk melihat kerosakan DNA melalui dua parameter iaitu peratus DNA ekor dan momen ekor.

Ujian Statistik

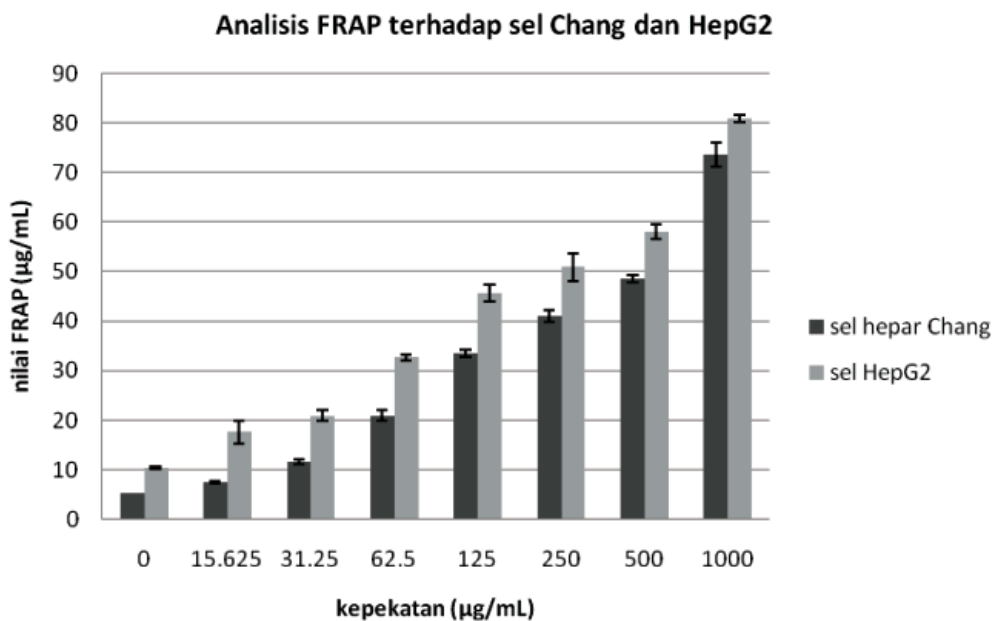
Data yang diperolehi dianalisis menggunakan ujian statistik melalui perisian SPSS versi 12. Aras signifikan yang digunakan dalam setiap ujian statistik ialah $p < 0.05$.

Hasil Kajian

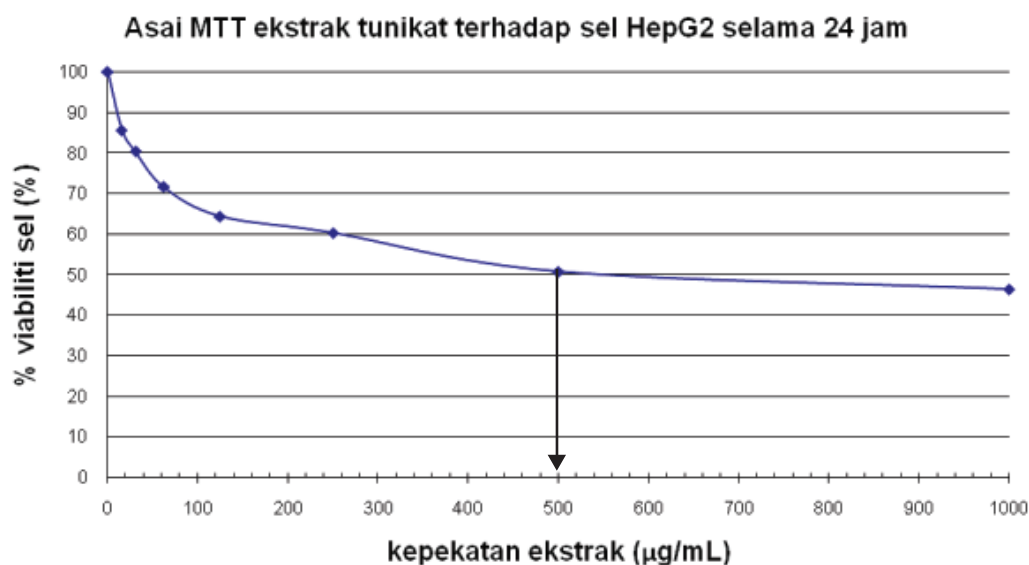
Analisis FRAP digunakan untuk mengukur kapasiti antioksidan yang terdapat di dalam ekstrak metanol tunikat. Analisis ini dijalankan ke atas ekstrak dengan menggunakan kepekatan tertinggi iaitu 1mg/mL. Pada kepekatan ini, nilai FRAP yang diperolehi adalah 25.78 µg/mL dan nilai FRAP semakin menurun apabila kepekatan ekstrak semakin berkurang (Rajah 1). Apabila analisis FRAP dijalankan ke atas sel yang dirawat dengan ekstrak, nilai FRAP didapati meningkat kepada 80.9 µg/mL pada sel HepG2 dan 73.57 µg/mL pada sel hepar Chang (Rajah 2). Kesan sitotoksik ekstrak ke atas sel selanjut dinilai melalui asai MTT. Dalam asai ini, kepekatan ekstrak tertinggi yang digunakan adalah 1 mg/mL untuk sel HepG2 dan 10 mg/mL untuk sel hepar Chang. Graf menunjukkan terdapat penurunan peratus viabiliti sel HepG2 dan sel hepar Chang dengan peningkatan kepekatan ekstrak yang digunakan. Nilai IC_{50} yang diperolehi bagi sel HepG2 adalah 0.5 mg/mL manakala 8.6 mg/mL bagi sel hepar Chang (Rajah 3 dan Rajah 4). Kesan genotoksik ekstrak terhadap sel pula dinilai menggunakan asai Komet Beralkali menggunakan nilai IC_{25} yang diperolehi daripada asai MTT. Kepekatan IC_{25} bagi sel HepG2 adalah 0.05 mg/mL manakala bagi sel hepar Chang adalah 0.3 mg/mL. Kesan kerosakan DNA oleh ekstrak ke atas kedua-dua sel dinilai berdasarkan dua parameter iaitu peratus DNA ekor dan momen ekor. Peratus DNA ekor pada sel HepG2 adalah 9.75% manakala pada sel hepar Chang pula adalah 7.56% (Rajah 5). Kedua-dua nilai ini lebih rendah jika dibandingkan



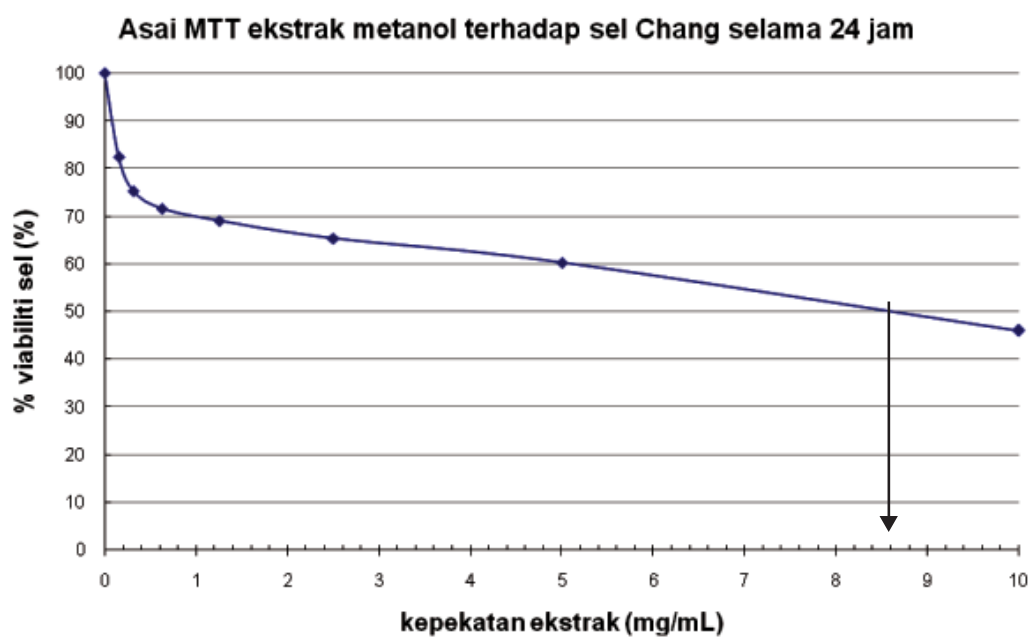
RAJAH 1: Carta Bar Menunjukkan Perubahan Nilai FRAP Melawan Kepekatan Ekstrak Metanol Tunikat



RAJAH 2: Carta Bar Menunjukkan Perubahan Nilai FRAP Melawan Kepekatan Ekstrak Tunikat Selepas Sel HepG2 dan Sel Hepar Chang Dirawat dengan Ekstrak Selama 2 Jam



RAJAH 3: Graf Lengkuk Menunjukkan Perubahan Peratus Viabiliti Sel HepG2 Melawan Kepekatan Ekstrak Tunikat Selepas Rawatan Selama 24 Jam. Nilai Kepekatan Perencatan (IC_{50}) Adalah 0.5 mg/mL

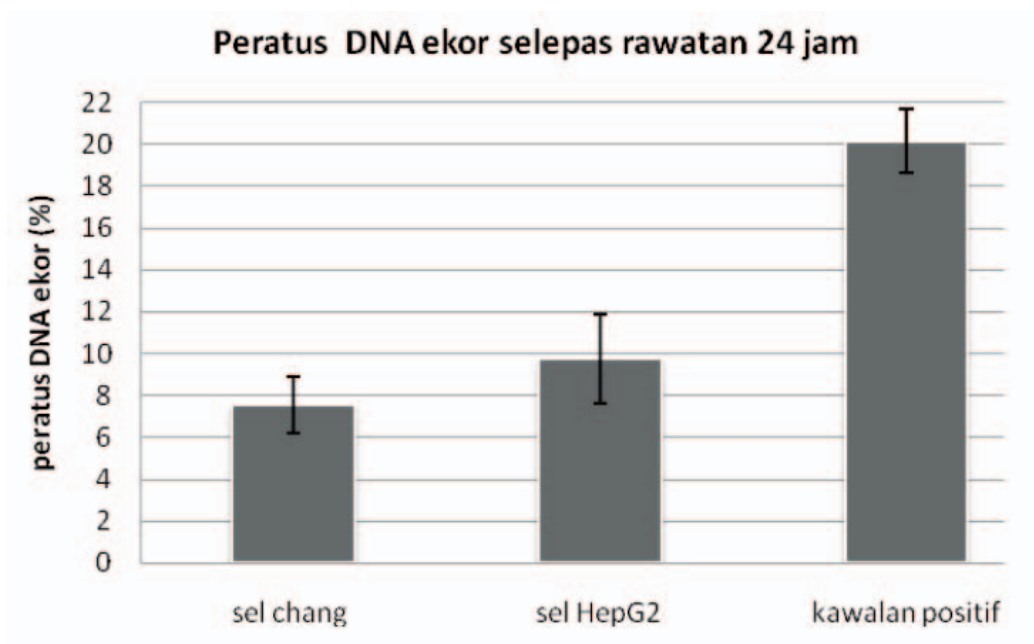


RAJAH 4: Graf Lengkuk Menunjukkan Perubahan Peratus Viabiliti Sel Hepar Chang Melawan Kepekatan Ekstrak Tunikat Selepas Rawatan Selama 24 jam. Nilai IC_{50} Adalah 8.6 mg/mL.

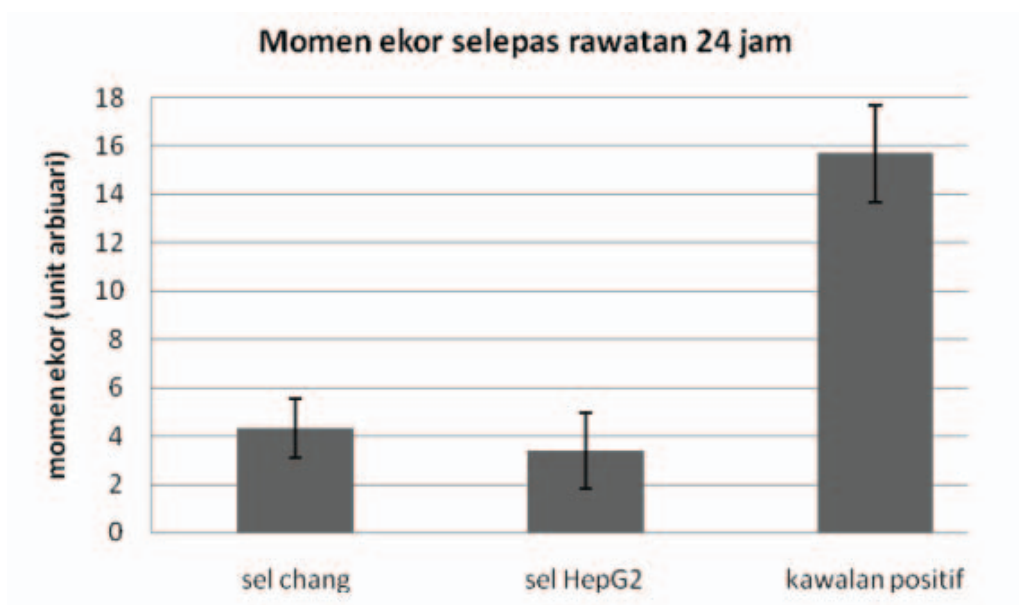
dengan kawalan positif yang mencatatkan peratus DNA ekor sebanyak 20.14%. Manakala, nilai momen ekor bagi sel HepG2 dan sel hepar Chang masing-masing adalah 3.4 unit dan 4.32 unit (Rajah 6). Kawalan positif mencatatkan momen ekor yang lebih tinggi iaitu sebanyak 15.68 unit.

Perbincangan

Berdasarkan analisis FRAP yang telah dijalankan, didapati ekstrak tunikat mempunyai aktiviti antioksidan walaupun pada kadar yang rendah. Walau bagaimanapun, kapasiti antioksidan ini meningkat apabila ekstrak ditindakkan terhadap kedua-dua sel selanjara. Pada kepekatan 1 mg/mL ekstrak, nilai FRAP yang dicatatkan oleh sel HepG2 ialah 70.58 $\mu\text{g/mL}$ manakala 68.24 $\mu\text{g/mL}$ pada sel hepar Chang. Daripada ujian sitotoksiti asai MTT pula, nilai IC_{50} yang diperolehi menunjukkan ekstrak metanol memberikan kesan yang lebih kuat terhadap sel HepG2 berbanding sel hepar Chang. Ini dibuktikan melalui nilai IC_{50} sel HepG2 yang lebih rendah iaitu 0.5 mg/mL berbanding nilai IC_{50} sel hepar Chang iaitu 8.6 mg/mL. Ini menunjukkan ekstrak tunikat memberikan kesan sitotoksik terhadap sel hepatoblastoma berbanding sel hepar normal dan berpotensi merawat sel kanser tanpa menjejaskan sel normal. Ini dibuktikan melalui nilai IC_{50} yang lebih tinggi berbanding yang didapati bagi sel kanser hepatoblastoma. Biasanya, kematian sel berkait rapat dengan kerosakan DNA sel. Oleh itu, untuk melihat kesan



RAJAH 5: Carta Bar Menunjukkan Peratus DNA Ekor yang Diperolehi Selepas Sel HepG2 dan Sel hepar Chang Dirawat dengan Ekstrak Selama 24 Jam. Kepekatan IC_{25} bagi Sel HepG2 ialah 0.05 mg/mL Manakala bagi Sel Hepar Chang ialah 0.3 mg/mL. Kawalan Positif adalah 50 μM H_2O_2 .



RAJAH 6: Carta Bar Menunjukkan Nilai Momen Ekor yang Diperolehi Selepas Sel HepG2 dan Sel Hepar Chang Dirawat dengan Ekstrak Selama 24 Jam. Kepekatan IC_{25} bagi Sel HepG2 ialah 0.05 mg/mL Manakala bagi Sel Hepar Chang ialah 0.3 mg/mL. Kawalan Positif adalah 50 μM H_2O_2 .

kerosakan DNA yang mungkin terjadi akibat tindakan ekstrak terhadap sel, asai Komet beralkali digunakan. Walau bagaimanapun, daripada asai Komet beralkali yang dijalankan, didapati nilai IC_{25} ekstrak tidak memberikan kesan genotoksiti terhadap kedua-dua sel. Ini dapat dilihat daripada peratus DNA ekor yang tidak melebihi 10 peratus dan nilai momen ekor yang tidak melebihi 5 unit (Olive et al. 1990).

Kesimpulan

Kajian ini menunjukkan bahawa ekstrak metanol tunikat memberikan kesan sitotoksik tetapi tidak menyebabkan genotoksiti terhadap sel selanjir hepatoblastoma HepG2. Walau bagaimanapun, ekstrak tunikat tidak memberikan kesan sitotoksik dan genotoksik terhadap sel selanjir hepar Chang.

Penghargaan

Setinggi penghargaan dirakamkan kepada Pusat Penyelidikan Ekosistem Marin (EKOMAR), Fakulti Sains dan Teknologi, terutamanya Prof. Dr. Che Abd Rahim Mohamed, Penyelaras EKOMAR dan En. Shamsul, En. Shahrim dan Cik Hana Badriah atas kerjasama dan bantuan bagi mendapatkan sampel untuk kajian ini.

Rujukan

- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay. *Analyt Biochem* 239: 70-76.
- Concepcion, G.P., Caraan, G.B., Lazaro, J.E. & Camua, A.R. 1994. Antibacterial and Antifungal Activity Demonstrated in Some Philippine Sponges and Tunicates. *Philippine J Microb Infect Disease* 24(1): 6-19.
- Kaou, A.M., Mahiou-Leddet, V., Hutter, S., Ainouddine, S., Hassani, S., Yahaya, I., Azas, N., Ollivier, E. 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 116: 74-83.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immun Method* 65: 55-63.
- Ogi, T., Taira, J., Margiastuti, P. & Ueda, K. 2008. Cytotoxic Metabolites from the Okinawan Ascidian *Diplosoma virens*. *Molecules* 13: 595-602.
- Olive, P.L., Banath, J.P. & Durand, R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the Comet assay. *Radiation Research* 122: 86-94.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low level of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
- Takeara, R., Jimenez, P.C., Wilke, D.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., Lopes, N.P., Lopes, J.L.C., Lotufo, T.M.C., Costa-Lotufo, L.V. 2008. Antileukemic effects of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidacea) constituents. *Comp Biochemy Physiol* 151: 363-369.