

Aktivitas Antikanker Senyawa *Brusein-A* terhadap Ekspresi *Bax* pada Tikus yang Diinduksi *Dimetilbenz(α)antrasen*

Muhartono¹, Subeki²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

Abstrak

Brusein-A dari buah makasar (*Brucea javanica*) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kanker payudara secara *in vitro* dengan nilai IC₅₀ 0,54 mg/L. Mekanisme *Brusein-A* dalam mematikan sel kanker payudara diduga melalui apoptosis. Salah satu protein yang memegang peranan penting adalah *Bax*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker senyawa *brusein-A* terhadap ekspresi *Bax* pada tikus yang diinduksi DMBA. Penelitian dilakukan pada tikus betina umur 12 minggu yang diberi DMBA 20 mg/KgBB selama 3 minggu sampai terbentuk kanker payudara. Tikus dibagi 9 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Selanjutnya *Brusein-A* diberikan secara oral pada masing-masing kelompok tikus dengan dosis 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, dan 20 mg/kg. Perlakuan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Selanjutnya tikus dipelihara selama 28 hari dan diberikan makan minum *ad libitum*. Tikus selanjutnya dimatikan dan jaringan kanker payudara diperiksa dengan imunohistokimia *Bax*. Ekspresi *Bax* dinilai berdasarkan persentase sitoplasma yang berwarna coklat. Hasil penelitian menunjukkan pada dosis 0 mg/L ekspresi *bax* sebanyak 1%, dosis 2,5 mg/L sebesar 10%, dosis 5 mg/L sebesar 20%, dosis 7,5 mg/L sebesar 30%, dosis 10 mg/L sebesar 40%, dosis 12,5 mg/L sebesar 55%, dosis 15 mg/L sebesar 65%, dosis 17,5 mg/L sebesar 80%, dan dosis 20 mg/L sebesar 95%. Hasil analisis *Chi-square* didapatkan hasil $p=0.0001$. Terdapat hubungan yang bermakna antara peningkatan dosis *Brusein-A* dengan ekspresi *Bax* pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Kata kunci: *brusein-A*, buah makasar, gen *bax*, kanker payudara

Anticancer Activity of *Brusein-A* Against *Bax* Expression on Rat Induced *Dimetilbenz(α)antrasen*

Abstract

Brusein-A from makassar fruit (*Brucea javanica*) has anticancer activity for breast cancer with *in vitro* value of IC₅₀ 0,54 mg/L. The *Brusein-A* mechanism in killing breast cancer cells is suspected through apoptosis. One of the proteins that plays an important role is *Bax*. This study aims to determine the anticancer activity of *Brusein-A* compound to *Bax* expression of a DMBA-induced rat. The study was conducted on 12 week old female rat fed DMBA 20 mg/KgBB for 3 weeks until breast cancer was established. Rat divided into 9 groups and each group consists of 3 rat. Furthermore, *Brusein-A* was administered orally to each group of rat at doses of 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, and 20 mg / kg. The treatments were arranged in a complete randomized design with 3 replications. Furthermore, rats were kept for 28 days and fed *ad libitum*. The rat were scarified and breast cancer tissue is examined with *Bax* immunohistochemistry. *Bax* expression was assessed by percentage of brown cytoplasm. The results showed at dose 0 mg/L *bax* expression as much as 1%, dose 2.5 mg/L by 10%, dose 5 mg/L by 20%, dose 7,5 mg/L equal to 30%, dose 10 mg/L by 40%, dose 12,5 mg/L 55%, dose 15 mg/L equal to 65%, dose 17,5 mg/L equal to 80%, and dose 20 mg/L equal to 95%. Chi-square analysis, the result $p = 0.0001$. There was a significant association between increased *Brusein-A* dose and *Bax* expression in DMBA-induced mouse breast cancer.

Keywords: *bax* gene, breast cancer, *brusein-A*, makasar fruit,

Korespondensi: dr. Muhartono, M.Kes., Sp. PA, alamat Jl. Soemantri Brodjonegoro No. 1, HP 081272358340, e-mail dmuhartono@yahoo.com

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit yang sangat berbahaya penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler. Pengobatan kanker payudara dapat dilakukan dengan radiasi, pembedahan, dan kemoterapi. Akan tetapi, pengobatan tersebut sering menimbulkan efek samping seperti penyebaran sel kanker ke bagian lain, merusak sel sehat, serta dapat mengakibatkan sel kanker bermutasi hingga sulit untuk dihancurkan. Salah satu alternatif adalah

dengan memanfaatkan senyawa *brusein-A* yang diisolasi dari buah makasar (*Brucea javanica*).¹

Buah makasar merupakan tanaman obat yang banyak digunakan untuk menyembuhkan penyakit malaria, disentri, demam berdarah, dan kanker. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa *quasinoid* dari tanaman ini mempunyai aktivitas antitumor.^{2,3,4} Pemberian senyawa *brusein-A* yang dikapsulasi liposom pada dosis 10 mg/kg berat badan dapat mematikan sel kanker

payudara pada mencit (Subeki et al., 2013).⁵ *Brusein-A* mempunyai kemampuan meningkatkan ekspresi *p53* dan menurunkan ekspresi *Bcl2* yang pada akhirnya menginduksi apoptosis pada kanker.⁶

Selain meningkatkan ekspresi *p53*, *Brusein-A* juga diduga mampu meningkatkan ekspresi *Bax*. Gen ini merupakan salah satu gen yang berperan dalam proses apoptosis pada sel kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih mendalam terhadap mekanisme *Brusein-A*, terutama pengaruhnya terhadap ekspresi *Bax* pada kanker payudara. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan mekanisme senyawa *brusein-A*, yang dapat dibuat dari buah makasar yang banyak tumbuh di Indonesia, dalam mematikan sel kanker payudara.

Metode

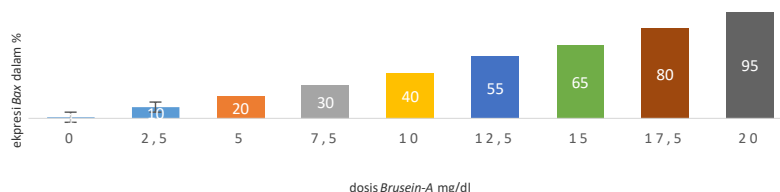
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Komponen Bioaktif, kandang percobaan, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Urip Sumoharjo dan Laboratorium Biokimia, Puspipstek Serpong. Penelitian berlangsung selama 2 tahun yaitu 2015-2016. Penelitian ini diawali dengan proses produksi senyawa *brusein-A* dari buah makasar sesuai dengan prosedur subeki et al., 2007.⁷ Selanjutnya untuk membuktikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah *brusein-A* maka dilakukan analisis spektroskopi IR, MS, dan NMR serta dibandingkan dengan standar *brusein-A*.

Tikus betina umur 12 minggu dikelompokkan menjadi 9 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor yang ditempatkan dalam kandang terpisah serta diberikan makan minum *ad libitum*.

Sebelum diperlakukan, tikus diadaptasikan dalam lingkungan percobaan selama 3 hari. Semua kelompok tikus diberikan senyawa DMBA (*dimetilbenz(α)antrasena*) secara oral dengan dosis 20 mg/kg berat badan seminggu dua kali selama 3 minggu agar terbentuk kanker payudara pada tikus. Selanjutnya *brusein-A* diberikan secara oral pada masing-masing kelompok tikus dengan dosis masing-masing 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, dan 20 mg/kg berat badan sehari sekali selama 7 hari berturut-turut. Satu kelompok tikus digunakan sebagai kontrol tanpa pemberian *brusein-A*. perlakuan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Selanjutnya tikus dipelihara selama 28 hari dan diberikan makan minum *ad libitum*. Ekspresi *Bax* adalah banyaknya sel kanker payudara tikus yang terekspresi *Bax* setelah pemberian senyawa aktif dengan mengamati pewarnaan imunohistokimia *Bax*. Skor 1 terekspresi <25%; Skor 2 terekspresi 25–50%; Skor 3 terekspresi >75%.

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan pada dosis 0 mg/L ekspresi *bax* sebanyak 1%, dosis 2,5 mg/L sebesar 10%, dosis 5 mg/L sebesar 20%, dosis 7,5 mg/L sebesar 30%, dosis 10 mg/L sebesar 40%, dosis 12,5 mg/L sebesar 55%, dosis 15 mg/L sebesar 65%, dosis 17,5 mg/L sebesar 80%, dan dosis 20 mg/L sebesar 95%. (Grafik 1). Dengan analisis *Chi-square* didapatkan hasil $p=0,0001$. Terdapat hubungan yang bermakna antara peningkatan dosis *Brusein-A* dengan ekspresi *Bax* pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.



Gambar 1. Grafik hubungan antara dosis *Brusein A* dan ekspresi *Bax*

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis *Brusein-A* maka ekspresi protein *Bax* semakin tinggi. *Bax* merupakan salah satu protein penting yang berperan pada proses apoptosis dan termasuk famili dari *Bcl-2*, apoptosis seperti halnya karsinogenesis berhubungan dengan berbagai gen yang mengatur perkembangan sel. Kelainan pada aktivitas proliferasi sel juga berhubungan erat dengan kontrol apoptosis, sehingga ada dugaan bahwa pada kanker terjadi kelainan pada berbagai gen yang terlibat dalam apoptosis yang berakibat disregulasi proses yang juga berakibat disregulasi apoptosis.⁸

Apoptosis, yang merupakan *programmed cell death*, terjadi normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk memelihara populasi sel dalam jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan, misalnya reaksi imun atau apabila sel rusak akibat penyakit atau agen perusak. Walaupun ada berbagai jenis rangsangan dan keadaan, baik fisiologik ataupun patologik, tidak semua sel harus mati sebagai respon terhadap rangsangan yang sama. Obat yang digunakan untuk terapi kanker menyebabkan kerusakan DNA dalam sel yang dapat berakibat apoptosis melalui jalur *p53*. Mekanisme kerja *p53* sangat kompleks. Ia dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Dalam beberapa penelitian terakhir mengatakan bahwa *p53* dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis tergantung situasi dan latar belakang sel.⁹

Diduga *Brusein-A* mengaktivasi perubahan porus permeabilitas mitokondria terjadi pada lapisan dalam (*inner mitochondrial permeability transition pore*) yang didalamnya diatur oleh matrix Ca^{2+} , pH dan voltage.¹⁰ Protein famili *Bcl-2* dapat menginduksi atau menghambat pengeluaran sitokrom-c ke dalam sitosol yang akan mengaktivasi Caspase 9 dan Caspase 3, menghasilkan proses apoptosis.¹¹ Pelepasan sitokrom-c secara tidak langsung dimediasi oleh potensial transmembran *pore* pada membran mitokondria lapisan dalam (*inner*). Kadar protein *Bcl-2* yang tinggi akan menghindarkan/menjaga sel-sel dari kematian

awal sel oleh apoptosis. Protein *Bcl-2* akan menekan proses apoptosis dengan cara mencegah aktivasi Caspase yang akan menghasilkan proses tersebut.¹⁰ *Bcl-2* sering terekspresi berlebihan pada berbagai keganasan meskipun tanpa adanya translokasi kromosom yang mengakibatkan perubahan gen *Bcl-2*. Peningkatan ekspresi *Bcl-2* dapat menyebabkan resistensi terhadap obat kemoterapi dan terapi radiasi.¹⁰ Pemaparan berlebihan dari *Bcl-2* dapat menghasilkan akumulasi sel pada fase G_0 dari siklus sel dan menyebabkan suatu kondisi kemoresisten.^{10,11} Ekspresi *BCL-2* dan *BAD* dapat digunakan sebagai faktor prognosis kanker payudara. Gabungan deteksi *BCL-2* dan *BAD* dapat digunakan memprediksi respon obat antikan.¹² Apabila aktivasi apoptosis *Bak* dan atau *Bax* akan membentuk mitokondrial apoptosis-induced channel (MAC) dan melakukan mediasi keluarnya sitokrom-c. Anti-apoptosis *Bcl-2* akan menghalangi proses tersebut melalui jalur inhibisi *Bax* dan atau *Bak*.¹⁰

Simpulan

Terdapat hubungan yang bermakna antara peningkatan dosis *Brusein-A* dengan ekspresi *Bax* pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Daftar Pustaka

1. Ningrum SM. Kajian aktivitas antikanker senyawa brusein-a dari buah makasar (*Brucea javanica*) terhadap sel kanker payudara (T47D). Bandar Lampung: Fakultas Pertanian Unila; 2010.
2. Lee KH, Imakura Y, Sumida Y, Wu RY, Hall IH, Huang HC. Antitumor agents, isolation and structural elucidation of bruceoside A and B, novel antileukemic quassinoid glycosides, and bruceine D and E from *Brucea javanica*. Journal of Organic Chemistry. 1979; 44: 2180-5.
3. Fukamiya N, Okano M, Miyamoto M, Tagahara K, Lee KH. Antitumor agents, 127. Bruceoside C, a new cytotoxic quassinoid glucoside, and related compounds from *Brucea javanica*. J. Nat. Prod. 1992; 55: 468-75.
4. Rachman EPN, Suhesti TS, Widiastuti R, Aditijono. The breast of anticancer from

- leaf extract of *Annona muricata* against cell line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2012; 2(1):157-64
5. Subeki, Setyaningrum E, Waluyo R. Penggunaan brusein-A dari buah makasar (*Brucea javanica*) sebagai obat kanker payudara di Indonesia [Laporan Penelitian]. Bandar Lampung: Lembaga Penelitian Universitas lampung; 2013.
6. Pardhasaradhi BVV, Reddy M, Ali AM, Kumari AL, Khar A. Differential cytotoxic effects of *annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. *J Biosci*. 2005; 30(2):101-8.
7. Subeki, Matsuura H, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, Nabeta K, et al. Screening of some Indonesian medicinal plants for antibabesial activity and isolation of new quassinoids from *Brucea javanica*. *J. Nat. Prod*. 2007; 70: 1654-7.
8. Wu M, Ding HF, Fisher DE. Apoptosis: molecular mechanisms. *Life Sci*. 2001; 2001:1–8.
9. Bailey ST, Shina H, Westerlinga T, Liua XS, Brown M. Estrogen receptor prevents p53-dependent apoptosis in breast cancer. *PNAS*. 2012; 109(44):18060–5.
10. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55:178–94.
11. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis and disease. Edisi ke-7. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
12. Yu B, Sun X, Shen H, Gao F, Fan Y, Sun Z. Expression of the apoptosis-related genes BCL-2 and BAD in human breast carcinoma and their associated relationship with chemosensitivity. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2010; 29(107): 1–7.