**AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA BRUSEIN-A TERHADAP EKSPRESI BAX**

**PADA TIKUS YANG DIINDUKSI DIMETILBENZAANTRASEN**

Muhartono1, Subeki2

1. Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

2. Jurusan Teknologi Hasil Pangan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung

**ABSTRAK**

Brusein-A dari buah makasar (Brucea javanica) mempunyai aktivitas antikanker 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 prosentase 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%. Dengan analisis chi-square didapatkan hasil p=0.00001. Terdapat hubungan yang bermakna antara peningkatan dosis Brusein-A dengan ekpresi Bax pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Kata kunci: brusein-A, buah makasar, Brucea javanica, gen p53, kanker payudara

Latar Belakang

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).

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 (Lee et al., 1984; Fukamiya et al., 1992; Rahman et al., 2012). 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). Brusein-A mempunyai kemampuan meningkatkan ekspresi p53, menurunkan ekspresi Bcl2, dan meningkatkan ekspresi bax, yang pada akhirnya menginduksi apoptosis pada kanker (Pardhasaradhi et al., 2005).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa turunan asetogenin mempunyai peranan apoptosis dalam mengeliminir sel‒sel kanker (Coothankandaswamy *et al.,* 2010; Cerella *et al.,* 2013; Torres *et al.,* 2012). Senyawa aktif *squamocin* merupakan turunan asetogenin bersifat sitotoksik terhadap pertumbuhan kanker kantung kemih T24 secara *in vitro* dengan cara menginduksi ekspresi *Bax* dan *Bad* (Yuan *et al.,* 2006). Asetogenin dapat meningkatkan ekspresi *p53*, menurunkan ekspresi *Bcl2*, dan meningkatkan ekspresi *Bax* pada *human tumour cell lines* yang pada akhirnya dapat menginduksi apoptosis (Pardhasaradhi *et al.,* 2005). Pada penelitian menggunakan MCF‒7 *xenograft* pada tikus yang diberikan asetogenin, disimpulkan bahwa *annonacin* dapat menginduksi *growth arrest* dan apoptosis. *Annonacin* dapat menghambat *cyclin D1* dan *Bcl2* (Ko *et al.*, 2011).

Salah satu senyawa golongan asetogenin yang belum banyak diteliti adalah Brusein-A, Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih mendalam terhadap mekanisme Brusein -A, terutama pengaruh Brusein-A terhadap ekspresi *Bax* pada kanker payudara..Diharapkan hasil penelitian ini akan diketahui mekanisme senyawa brusein-A dalam mematikan sel kanker payudara dan dapat dibuat dari bahan baku tanaman buah makasar yang banyak tumbuh di Indonesia.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Komponen Bioaktif, kandang percobaan, Laboratorium Jurusan Pendidikan Dokter, serta Laboratorium Analisa Darah Rumah Sakit Urip Sumoharjo, Laboratorium Biokimia, Puspiptek 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. Selanjutnya untuk membuktikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah brusein-A maka dilakukan analisis spektroskopi IR, MS, dan NMR serta dibandingkan dengan standar brusein-A.

**Uji Senyawa Brusein-A terhadap Ekspresi Gen Bax**

 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 (dimetilbenzantrazena) 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 pemberiaan senyawa aktif dengan mengamati pewarnaan imunohistokimia Bax. Skor 1 terekspresi <25%; Skor 2 terekspresi 25–50%; Skor 3 terekspresi >75%.

**BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

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=0.00001. Terdapat hubungan yang bermakna antara peningkatan dosis Brusein-A dengan ekpresi Bax pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Grafik 1. Hubungan antara dosis Brusein A dan ekspresi Bax pada Kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis Brusein-A maka ekspresi protein Bax semakin tinggi. Bax merupakan salah satu protein penting yang berperanan 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. 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 (Weinberg, 2007).

Diduga Brusein A mengaktivasi perubahan porus permeabilitas mitokondria terjadi pada lapisan dalam (*inner mitochondrial permeability transition pore*) yang didalamnya diatur oleh matrix Ca2+, pH dan voltage (Ghobrial *et al.,* 2005). 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 (Kumar *et al.,* 2005). 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 (Ghobrial *et al.,* 2005). 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 (Ghobrial *et al.,* 2005). Pemaparan berlebihan dari Bcl-2 dapat menghasilkan akumulasi sel pada fase G0 dari siklus sel dan menyebabkan suatu kondisi kemoresisten (Ghobrial *et al.,* 2005; Kumar *et al.,* 2005). Ekspresi BCL-2 dan BAD dapat digunakan sebagai faktor prognosis kanker payudara. Gabungan deteksi BCL-2 dan BAD dapat digunakan memprediksi respon obat antikanker (Yu *et al.,* 2010). Apabila aktivasi apoptosis Bak dan/Bax akan membentuk mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) dan melakukan mediasi keluarnya sitokrom-c. Anti-apoptosis Bcl-2 akan menghalangi proses tersebut melalui jalur inhibisi Bax dan/Bak (Ghobrial et al., 2005).

**Simpulan**

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

**DAFTAR PUSTAKA**

Abdul, E., Shuaib, H. 2012. P53 expression in ovarian tumors: (an immunohistochemical study). *Ann.Coll.Med. Mosul*. 38 (2):73-79.

Aminah, S. 2004. Aktivitas Antioksidan dan Antiproliferasi Sel Kanker K-562 pada Minuman Formulasi Susu Jahe (Zingiber officinale Roscoe) Sterilisasi. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.

Baileya, S.T., Shina, H., Westerlinga, T., Liua, X.S., Brown, M. 2012. Estrogen receptor prevents p53-dependent apoptosis in breast cancer. PNAS 109(44):18060–18065.

Choudhury, M., Seema, G., Mukta, P., Meenu, P. 2012. A Cytohistological study of p53 overexpression in ovarian neoplasm. *South Asian Jounal of Cancer.* Vo.1 :59-65.

Clarke, B.A., Gilks, M.D. 2011. Ovarian Carcinoma: Recent Development in Classification of Tumour Histological Subtype. *Canadian Journal of Pathology*. 33-34.

Fauzan, R. 2009. Gambaran faktor penggunaan kontrasepsi terhadap angka kejadian kanker payudaradi RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta berdasarkan pemeriksaan histopatologik tahun 2003-2007. Tesis. Jakarta: Universitas Indonesia.

Fukamiya, N., Okano, M., Miyamoto, M., Tagahara, K., Lee, K.H. 1992. Antitumor agents. 127. Bruceoside C, a new cytotoxic quassinoid glucoside, and related compounds from *Brucea javanica*. *J. Nat. Prod.* 55: 468-475.

Graeff, P.D., Hall. J., Paul, J., Brown, R., Hollema, H. 2006. Factors Influencing p53 Expression in Ovarian Cancaer as a Biomarker of Clinical Outcome in Multicentre Studies. *British Journal of Cancer*. 95:627-633.

Granstrom, C. 2008. Population Attributable Fractions for Ovarian Cancer in Swedish Women by Morphological. htto://www.j acfaitilmnih.pov/pmc/articles/PMC23/. Cited 2010 october10.

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 55:178–94.

Hahn, D.B., Payne, W.A. 2010. Focus on Health. Mc Graw Hill. New York.

Havrilesky. 2003. Significance of p53 Mutation and p53 Overexpression in

Advanced Epithelial Ovarian Cancer-A Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 21(20): 3814-3825.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2005. Robbins and Cotran pathologic basis and disease, 7th ed. Philadelpia: Elsevier Sounders.

Kupryjanczyk, J., Kraszewska, E., Seta, Z. 2008. TP53 status and taxane-platinum‑

based therapy in ovarian cancer patients: a non randomized retrospective study. *BMC Cancer*. 8(27): 1471-240.

Lacle, M.M., Pol, C.V.D. Witkamp, A., Wall, E.V.D., Diest, P.J.V. 2013. Prognostic value of mitotic index and bcl2 expression in male breast cancer. *Plos One* 8(4):1–6.

Lee, K.H., Imakura, Y., Sumida, Y., Wu, R.Y., Hall, I.H., Huang, H.C. 1979. 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*. 44: 2180-2185.

Lessene, G., Czabotar, P.E., Colman, P.M. 2008. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discover*. 7: 989–100.

Martinez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J.P.R., Melendez-Zajgla, J. 2008. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 27(48):1–7.

Meergans, T., Hildebrandt, A.K., Horak, D., Haenisch, C., Wendel, A. 2000. The short prodomain influences caspase 3 activation in HeLa cells. *Biochem J.* 349:135–140.

Mediawiki. 2007. Cancer. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2009.

Millour, J., de Olano, N., Horimoto, Y., Monteiro, L.J., Langer, J.K., Aligue, R., Hajji, N., Lam, E.W.F. 2012. ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance. *Mol Cancer Ther.* 10(6):1046–1058.

Miettinen, S. 2009. Targetting the Growth of Ovarian Cancer Cell (*dissertation*) Finland: University of Tampere.

Min, K.W., Park, M.H. 2007. The expression of c-erbB-2, EGFR, p53 and Ki-67 in ovarian borderline tumors and carcinomas of the ovary. *Korean J Pathol*. 41: 296-306

Ningrum, S.M. 2010. Kajian Aktivitas Antikanker Senyawa Brusein-A dari Buah Makasar (*Brucea javanica*) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D). Skripsi. Fakultas Pertanian Unila. Bandar Lampung.

Pardhasaradhi, B.V.V., Reddy, M., Ali, A.M., Kumari, A.L., Khar, A. 2005. Differential cytotoxic effects of annona squamosa seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. *J Biosci*. 30(2):101-108.

Putri, N.E. 2009. Inhibisi Fraksi Aktif Biji Mahoni pada Pertumbuhan Saccharomyces cerevisiae sebagai Uji Antikanker. Skripsi. Departemen Kimia. FMIPA IPB. Bogor.

Rauf, S., Masadah, H. 2009. The Prognostic Value of the p53 Gene Expression and Mutation in Ovarian Cancer. *Med J Indones*ia. 18:81-90

Ranasasmita, R. 2008. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Aglaia elliptica Blume Pada Tikus Betina Yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)antrasena. Skripsi. Program Studi Biokimia. FMIPA IPB. Bogor.

Sarkar, S., Mandal, M. 2009. Growth factor receptors and apoptosis regulators: signaling pathways, prognosis, chemosensitivity and treatment outcomes of breast cancer. *Basic and Clinical Research.* 3:47–60.

Subeki, Matsuura, H., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y., Nabeta, K., Takahashi, K., Katakura, K. 2007. Screening of Some Indonesian Medicinal Plants for Antibabesial Activity and Isolation of New Quassinoids from *Brucea javanica*. *J. Nat. Prod.* 70: 1654-1657.

Subeki, Setyaningrum, E., Rudiyanto, W. 2011. Aktivitas antikanker senyawa brusein-a buah makasar (*Brucea javanica*) terhadap sel kanker payudara (T47D). Seminar Nasional Sains dan Teknologi-IV. 865–77.

Subeki, Setyaningrum, E., Waluyo. 2013. Penggunaan brusein-A dari buah makasar (*Brucea javanica*) sebagai obat kanker payudara di Indonesia. Laporan penelitian Hibah Bersaing. Lembaga Penelitian Universitas lampung. Bandar Lampung.

Tront, J.S., Hoffman, B., Liebermann, D.A. 2006. GADD 45a Suppresses ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-jun nh2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res.* 66(17): 8448-8454.

Ting, J.F., Li, H.H., Ri, S.C., Jin, L. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 37(11):719–727.

Tim Patologi. 2007. Cara Kerja Pembuatan Preparat Histopatologi. BPPV Regional III Tanjung Karang. Bandar Lampung.

Wolfe, S. L. 1993. Molecular and Cellular Biology. Wadsworth Publishing Company. California.

Yayasan Kesehatan Payudara Jakarta. 2009. Sambutan Menteri Kesehatan Republik Indonesia dalam Peluncuran Unit Mobil Mamografi. <http:// www.pitapink.com/id/berita-detail.php?id=11>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2009.

Rachman, E. P.N., Suhesti, T.S., Widiastuti, R., Aditiyono. 2012. The breast of anticancer from leaf extract of Annona muricata against cell line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology.* 2(1):157-164

Yuan, S.S.F.,  [Chang](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503001905), H.L.,  [Chen](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503001905), H.W., Yeh, Y.T., Kao, Y.H., Lin, K.H., [Wu](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503001905), Y.C.,  [Su](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503001905), J.H. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuranacetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. [*Life Sci*](http://www.sciencedirect.com/science/journal/00243205)*.* 72(25): 2853–2861.

Yu, B., Sun, X., Shen, H., Gao, F., Fan, Y., Sun, Z. 2010. 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.* 29(107): 1–7.