

Pengaruh pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap ekspresi p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D

The effect of ethanolic and petroleum ether fractions of bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) bulb extract on expression of p53 mutant in breast cancer cell line T47D

IVAN HENDRA SUDARMAWAN, DJOKO DLIDIR, AMBAR MUDIGDO, DYAH RATNA BUDIANI

Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Desember 2009. Revisi disetujui: 25 Februari 2010.

Abstract. Sudarmawan IH, Dlidir D, Mudigdo A, Budiani DR. 2010. The effect of ethanolic and petroleum ether fractions of bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) bulb extract on expression of p53 mutant in breast cancer cell line T47D. *Biofarmasi* 8: 17-26. Breast cancer was still to be the most popular disease. The second highest morbidity and mortality stages after cervix cancer which need to be involved in alternative therapy. Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) had been used as anti-cancer in empiric therapy by urban society. Therefore, it was needed to determine the influence of etanolic and petroleum eter fractions of bawang dayak extract on the p53 mutant expression in T47D breast cancer cell in vitro. Epithelial cell in ductal mammae breast cancer T47D which had a malignancy and p53 mutant, with ER/PR positive status. As a comparison, it was used MCF7 cell specimen (negative control). They were cultured on 60 wells for T47D and MCF7 in RPMI 1640 media. Each well was filled with 2×10^5 cells/200 μ l media. Thirty wells with a size of 1.5 cm/T47D cell diameter, cultured in etanolic and petroleum eter fractions with under concentration of LC50. The number of sample was determined by using "Rule of Thumb". The result of LC50 on T47D breast cancer cell were etanolic fraction 125 μ g/mL, while petroleum eter fraction 31.25 μ g/mL. The result of expression percentage of p53 mutant given by the extract of etanolic fraction of bawang dayak were: 0 μ g/mL = 36.11%, 15.625 μ g/mL = 28.32%, 31.25 μ g/mL = 27.46%, 62.5 μ g/mL = 19.67%, and 125 μ g/mL = 11.02%. Other result of bawang dayak extract percentage given in petroleum eter fraction were: 0 μ g/mL = 26.16%, 3.90625 μ g/mL = 25.29%, 7.8125 μ g/mL = 22.70%, 15.625 μ g/mL = 22.27%, and 31.25 μ g/mL = 15.78%. The treatment of bawang dayak extract in etanolic and petroleum eter fractions were able to inhibit the expression of p53 mutant in vitro. The result of this research showed no significant difference in the inhibition expression of p53 mutant in breast cancer cell T47D.

Keywords: Bawang dayak, breast cancer cell T47D, ethanolic fraction, petroleum eter fraction, p53 mutant

PENDAHULUAN

Kanker payudara sampai saat ini masih merupakan penyakit yang memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas penderita tertinggi kedua setelah kanker leher rahim. Kanker payudara di Indonesia menunjukkan kecenderungan adanya peningkatan angka kejadian dari tahun ke tahun dengan nilai insidensi relatif sebesar 11,5%. Angka kejadian di Amerika Serikat 27 per 100.000 atau 18% dari kematian yang terjadi pada wanita (Tjindarbumi 2004). Terapi kanker payudara secara medis yang meliputi pembedahan, penyinaran, dan penggunaan obat sitostatik, belum menghasilkan penyembuhan yang sepenuhnya memuaskan bagi penderita, karena pada umumnya penderita datang ke dokter pada stadium kanker yang sudah lanjut. Oleh karena itu perlu dikembangkan terapi alternatif yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah untuk meringankan penderitaan dan meningkatkan kesembuhan (Ashariati 2005).

Selain prosedur baku secara medis, banyak cara yang dapat dilakukan penderita untuk mendapatkan kesembuhan dari penyakit kanker, salah satunya dengan menggunakan

tanaman obat (Ashariati 2005). Banyak jenis tanaman obat yang sudah lama dikenal sebagai obat antikanker, beberapa diantaranya sudah diisolasi bahan aktifnya dan dijadikan sebagai kemoterapi, seperti Taxan dan Placitaxel. Jenis obat-obatan kemoterapi berkembang dari empiris menuju klinis, ditunjukkan dengan adanya bukti bahwa banyak bahan sitostatika telah mendapatkan tempat yang tetap di klinik.

Kemoterapi yang telah tersedia saat ini belum sepenuhnya dapat mengatasi kanker dan secara klinis banyak menimbulkan efek samping, antara lain selektivitas yang rendah. Timbulnya berbagai efek samping dalam pemberian kemoterapi sebagai antikanker telah mendorong perlunya usaha untuk menemukan obat antikanker yang baru (Katzung 2001).

Tanaman obat Indonesia telah secara sporadis diteliti di berbagai universitas dan lembaga penelitian di Indonesia. Tujuan beberapa penelitian ini umumnya untuk membuktikan apakah penggunaan suatu jenis tanaman obat terhadap penyakit kanker dapat dibuktikan secara ilmiah (Aulia 2003). Penelitian-penelitian yang pernah ada sebelumnya lebih bersifat pembuktian atas rasionalitas atau

irrasionalitas penggunaan jenis tanaman tersebut sebagai obat dan bukan suatu pencarian obat baru. Berbagai jenis tanaman obat memang sudah biasa digunakan sebagai obat dan dirasakan efektivitasnya secara empiris, sehingga penelitian yang dilakukan adalah upaya untuk membuktikannya. Hasil-hasil penelitian mengenai jenis-jenis tanaman yang berpotensi untuk mengobati penyakit kanker dapat dikelompokkan menjadi: (i) tanaman obat yang bersifat sitotoksik dan sitostatik, (ii) tanaman obat yang bersifat imunostimulan, dan (iii) tanaman obat yang bersifat antioksidan (Ashariati 2005).

Di Indonesia, pengobatan tradisional dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan, termasuk penggunaan beberapa jenis tanaman yang berpotensi untuk menyembuhkan berbagai jenis kanker, sudah menjadi kebiasaan selama puluhan tahun. Meskipun demikian, bukti ilmiah tentang efektivitas penyembuhannya belum terungkap seluruhnya. Aktivitas antikanker suatu jenis tanaman obat atau senyawa dapat dievaluasi dari efek sitotoksitasnya secara *in vitro* pada berbagai macam sel kanker (Katzung 2001).

Pemahaman tentang perilaku sel kanker payudara serta faktor risikonya telah banyak mengubah konsep dasar pengobatan. Dengan berkembangnya teknologi kedokteran, menyebabkan modalitas terapi menjadi lebih beragam dan sangat mempengaruhi penderita, sehingga pemilihan jenis terapi dan seleksi penderita menjadi sangat penting (Albar et al. 2004). Kemajuan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran (Iptekdok), khususnya biomolekuler yang sangat pesat, tentunya mempengaruhi tata cara penanganan kanker payudara itu sendiri dari deteksi dini, diagnostik, dan terapi serta penanganan tindak lanjut. Informasi mengenai berbagai ekspresi protein spesifik dalam sel neoplasma dapat dipakai sebagai salah satu indikator untuk menentukan keganasan, pemilihan metode terapi, serta prognosisnya (Tjindarbumi 2004).

Dari beberapa hasil penelitian sebelumnya telah didapatkan sel kanker payudara yang memiliki mutasi pada protein p53. Mutasi pada gen p53 banyak dijumpai menyertai *genetic aberrations* selama karsinogenesis pada sebagian besar jenis kanker, termasuk kanker payudara dan *cancer-derived cell lines* (Smardova et al. 2005).

Galur sel kanker payudara T47D adalah galur sel kanker yang diisolasi dari penderita kanker payudara, serta merupakan *human ductal breast epithelial cancer cell line* (Flaman et al. 1995). Galur sel ini mengalami mutasi pada gen p53 pada posisi asam amino ke-194, dengan asam amino fenilalanin (Nigro et al. 1989). Disamping itu, T47D juga memiliki status *Estrogen Receptor* (ER) positif. Pada kondisi kultur normal, sel tersebut juga mengekspresikan *Progesterone Receptor* (PR).

Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) merupakan salah satu jenis tanaman obat yang selama ini dipercaya oleh masyarakat Kalimantan sebagai obat tradisional yang memiliki potensi sebagai herba antikanker. Namun, penelitian ilmiah yang mendukung potensi antikanker jenis tanaman tersebut belum banyak diteliti, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

Aulia (2003) melakukan penelitian tentang kandungan bawang dayak dengan fraksi etanolik dan petroleum eter,

dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak bawang dayak mempunyai efek sebagai antibakteri serta mengandung kumarin, terpenoid, flavonoid, dan antraknon yang berpotensi sebagai antikanker. Oleh karena itu dianggap perlu untuk melihat efek kedua fraksi tersebut sebagai antikanker yang didemonstrasikan secara *in vitro* dengan kultur sel kanker payudara T47D dan MCF7 melalui ekspresi gen p53 mutan.

Berdasarkan hal tersebut diperlukan penelitian mengenai potensi ekstrak bawang dayak dengan berdasarkan larutan penyaring yang berbeda, yaitu petroleum eter dan etanol, terhadap tingkat pemulihan kualitas struktur gen p53 mutan yang dimiliki oleh sel kanker payudara T47D sebagai model percobaan. Kualitas struktur gen p53 mutan pada sel T47D dibandingkan dengan tingkat ekspresi gen p53 *wild type* pada sel MCF7 sebagai kontrol negatif.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi etanolik terhadap penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*, (ii) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi petroleum eter terhadap penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*, (iii) Mengetahui perbedaan potensi penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan antara pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter pada biakan galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta pada bulan Februari 2008.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan meliputi *Laminary Air Flow Cabinet*, *Tissue Culture Flask* (TCF), *microplate* 96 sumuran, mikropipet, inkubator CO₂, sentrifuse, mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, *Improved Neubauer hemocytometer*, dan *Soxhlet*. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi serbuk umbi bawang dayak, galur sel kanker payudara T47D, MCF7, petroleum eter, dan alkohol absolut (96%).

Sampel penelitian

Sel kanker payudara T47D berasal dari *American Type Culture Collection*, sel ini merupakan sel epitel duktus mammae yang mengalami malignansi dan mutasi pada gen p53, dengan status ER dan PR positif. Sebagai pembanding (kontrol negatif) digunakan galur sel MCF7, sel ini merupakan sel epitel duktus mammae yang mengalami malignansi dan tidak mengalami mutasi pada gen p53. Sel ini kemudian dikulturkan pada media RPMI 1640 dengan FBS 10% dalam inkubator dengan suhu 37°C, antibiotik,

dan antifungal di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Jenis penelitian

Penelitian ini berupa penelitian prospektif dengan jenis penelitian eksperimental laboratorik. Teknik pengambilan sampel dilakukan berdasarkan *quota sampling*. Variabel terikatnya (*dependent*) adalah ekspresi gen p53 mutan, sedangkan variabel bebas (*independent*) adalah konsentrasi ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik atau fraksi petroleum eter.

Besar sampel

Penelitian ini menggunakan 60 *well* kultur sel T47D dan 60 *well* kultur sel MCF7 pada medium RPMI 1640. Masing-masing *well* berisi 2×10^5 sel/200 μ l media. Sebanyak 30 *well* dengan diameter 1,5 cm pada kultur sel T47D diperlakukan dengan fraksi etanolik umbi bawang dayak dengan konsentrasi 125 μ g/mL, 62,5 μ g/mL, 31,25 μ g/mL, 15,62 μ g/mL, dan 0 μ g/mL dengan masing-masing seri konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali, serta 30 *well* diperlakukan dengan fraksi petroleum eter dengan konsentrasi 31,25 μ g/mL, 15,62 μ g/mL, 7,8 μ g/mL, 3,9 μ g/mL, dan 0 μ g/mL dengan masing-masing seri konsentrasi diulang sebanyak 6 kali, demikian juga pada kultur sel MCF7. Penentuan jumlah sampel tersebut dilakukan dengan menggunakan patokan *rule of thumb*, berdasarkan pendapat Murti (1997) yang menyatakan bahwa besar sampel dalam sejumlah kelompok studi berdasarkan tingkat perlakuan sebaiknya jangan sampai kurang dari 5 subjek.

Cara kerja

Kultur sel T47D, MCF7, uji sitotoksitas dan persiapan kultur sel guna penentuan tingkat ekspresi p53 mutan:

Kultur galur sel kanker payudara T47D pada media RPMI 1640, yang diperkaya FBS (*Fetal Bovine Serum*), 10%, Antibiotik (Penstrep 1%) dan anti fungal (Amphotericin 1%).

Starvasi dilakukan setelah sel pada tahap (a) tumbuh, dilaksanakan dengan menumbuhkan sel ke dalam media RPMI 1640 dengan FBS 0,05 %, berikut antibiotik dan anti fungi. Tahapan ini bertujuan untuk menyamakan umur sel pada saat perlakuan.

Uji penghambatan pertumbuhan dan kematian sel dilaksanakan dengan perlakuan ekstrak batang bawang dayak fraksi etanol dan petroleum eter dengan variasi konsentrasi yang ditentukan kemudian.

Setelah LC50 ditentukan untuk masing-masing perlakuan sesuai dengan rumus *Abott* yang dilanjutkan dengan analisis probit, maka sel T47D ditumbuhkan pada media RPMI lengkap yang pada 30 *well microplate* dengan kepadatan 5.000 sel/250 μ l media/*well* dengan perlakuan masing-masing ekstrak dengan konsentrasi di bawah nilai LC50 dengan diberi alas *tissue culture cover slips* steril, dengan diameter : 13 mm, selama 3 hari (72 jam)

Setelah 3 hari dikulturkan, *tissue culture cover slips* yang telah terlekat penuh oleh sel kanker payudara T47D dan MCF7 difiksasi menggunakan metanol dan siap untuk dilaksanakan immunositokimia dengan menggunakan monoklonal anti bodi anti human p53 mutan. Sistem deteksi yang digunakan adalah Avidin Biotin Kompleks.

Perhitungan tingkat ekspresi p53 mutan dilaksanakan dengan menentukan prosentase jumlah sel positif p53 mutan pada tiap lapang pandang, pada perbesaran 400 kali. Lapang pandang yang digunakan sebanyak 9 lapang pandang tiap slide.

Sel dengan ekspresi p53 mutan positif ditandai dengan warna kuning keemasan hingga coklat pada inti sel dan sitoplasma sel T47D.

Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan SPSS 15. Jenis analisis yang digunakan adalah uji Kolmogorov-Smirnov untuk menguji distribusi data tergolong normal atau tidak. Analisis regresi korelasi linier dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter bawang dayak terhadap tingkat ekspresi gen p53 mutan. Uji selanjutnya adalah uji *t-test* untuk menguji perbedaan potensi penghambatan tingkat ekspresi gen p53 mutan antara fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter umbi bawang dayak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Penelitian ini menggunakan galur sel kanker payudara T47D (Gambar 1-18). Uji sitotoksitas pemberian ekstrak umbi bawang dayak dilakukan dengan menggunakan fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter. Penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada sel T47D dengan menggunakan fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ditentukan pada konsentrasi di bawah LC50. LC50 dari fraksi petroleum eter dan fraksi etanolik dijabarkan pada Tabel 1.

Pengujian ekspresi gen p53 mutan fraksi etanolik ekstrak umbi bawang dayak dilaksanakan pada seri konsentrasi LC50 dan di bawah LC50 sebagai berikut: 0 μ g/mL, 15,62 μ g/mL, 31,25 μ g/mL, 62,50 μ g/mL, dan 125 μ g/mL. Sementara itu, pengujian ekspresi gen p53 mutan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dilaksanakan pada seri konsentrasi di bawah LC50 sebagai berikut: 0 μ g/mL, 3,90 μ g/mL, 7,81 μ g/mL, 15,62 μ g/mL, dan 31,25 μ g/mL (Tabel 2).

Tabel 1. Tabulasi nilai LC50 fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak pada sel T47D

Jumlah Sel	Fraksi etanolik LC ₅₀ (μ g/mL)	Fraksi petroleum eter (μ g/mL)
T47D	125	31,25

Tabel 2. Tabulasi hasil pengamatan persentase p53 mutan pada sel T47D dengan pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak

Fraksi Etanolik			Fraksi Petroleum Eter		
Subjek	n	Rerata (%)	Subjek	n	Rerata (%)
TE 0 (Konsentrasi 0 µg/mL)	30	36,11	PE 0 (Konsentrasi 0 µg/mL)	30	26,16
TE 1 (Konsentrasi 15,625 µg/mL)	30	28,32	PE 1 (Konsentrasi 3,906 µg/mL)	30	25,29
TE 2 (Konsentrasi 31,25 µg/mL)	30	27,46	PE 2 (Konsentrasi 7,813 µg/mL)	30	22,70
TE 3 (Konsentrasi 62,5 µg/mL)	30	19,67	PE 3 (Konsentrasi 15,63 µg/mL)	30	22,27
TE 4 (Konsentrasi 125 µg/mL)	30	11,02	PE 4 (Konsentrasi 31,25 µg/mL)	30	15,78

Hasil analisis persentase gen p53 mutan pada sel T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dengan menggunakan uji *t-test* (SPSS 15) menunjukkan tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Sementara itu, hasil pengamatan persentase gen p53 mutan pada sel T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dengan menggunakan uji *t-test* (SPSS 15) didapatkan $\alpha = 0,475$. Dengan demikian, tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro* (Gambar 19-20).

Pembahasan

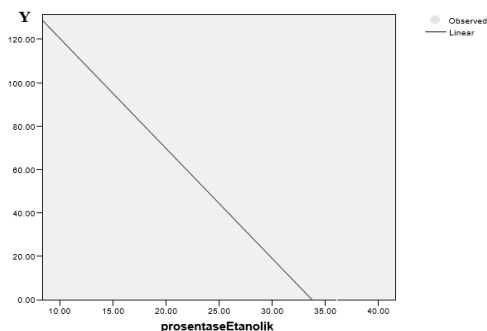
Hasil penelitian pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter yang dibuktikan

dengan uji korelasi regresi menunjukkan terdapat hubungan antara konsentrasi fraksi etanolik ekstrak umbi bawang dayak dengan ekspresi gen p53 mutan, dimana dengan peningkatan konsentrasi ekstrak umbi bawang dayak terjadi penekanan ekspresi gen p53 mutan secara *in vitro*. Hal ini sesuai dengan grafik korelasi regresi bahwa pada konsentrasi tertentu, ekspresi gen p53 mutan menunjukkan gambaran stasioner, yaitu pada konsentrasi 0 µg/mL, ekspresi gen p53 mutan sangat tinggi, sedangkan pada konsentrasi LC50 dan di atasnya terjadi penekanan terhadap ekspresi gen p53 mutan.

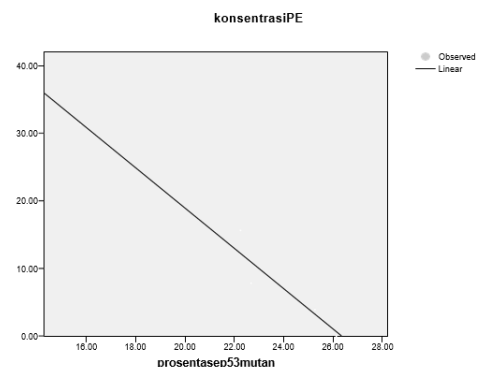
Berdasarkan hasil uji *Anova* satu jalur, fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Dengan tertekannya ekspresi gen p53 mutan tersebut memacu proses apoptosis dan penghambatan siklus sel (*cell cycle arrest*) yang memberikan kesempatan bagi sel untuk melakukan *DNA repair* sesuai dengan efek seluler *downstream* akibat dari aktivator *upstream* yang menyebabkan kerusakan DNA.

Hasil uji *t-test* menunjukkan tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa baik fraksi etanolik maupun petroleum eter mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan dengan konsentasi yang berbeda dan keduanya dapat digunakan sebagai terapi herba antikanker.

Penelitian ini membuktikan bahwa kematian sel kanker payudara T47D dan MCF7 disebabkan karena adanya induksi bahan aktif yang terkandung dalam kedua jenis fraksi umbi bawang dayak yang diujikan. Pemberian kedua fraksi ekstrak umbi bawang dayak mampu mengurangi aktivasi *oncogene*, memacu terjadinya apoptosis, dan berpotensi untuk mengaktivasi proses *DNA repair*. Hal ini ditunjukkan dengan semakin kecilnya persentase ekspresi gen p53 mutan pada sel T47D dengan pemberian konsentrasi baik fraksi etanolik maupun fraksi petroleum eter umbi bawang dayak.



Gambar 19. Uji pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi petroleum eter pada penekanan tingkat ekspresi p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*.



Gambar 20. Uji perbedaan potensi penghambatan ekspresi p53 mutan dengan uji *t-test*.

Penelitian ini membuktikan bahwa bahan aktif yang terlarut dalam etanol dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak berpotensi sebagai antikanker, setidaknya dalam hal mendukung terhentinya siklus sel, apoptosis, dan reparasi DNA. *Apoptosis* yang terjadi dapat dipacu oleh penekanan ekspresi gen p53 mutan atau peningkatan gen supresor kanker yang lain atau dapat juga melalui jalur lain. Dalam penelitian ini digunakan fraksi etanolik dan petroleum eter dari ekstrak umbi bawang dayak karena sesuai dengan penelitian Aulia (2003) yang menggunakan kedua fraksi tersebut sebagai antibakteri dan telah dibuktikan bahwa kandungan dari ekstrak umbi bawang dayak menggunakan kedua fraksi tersebut mempunyai senyawa yang berpotensi sebagai anti kanker.

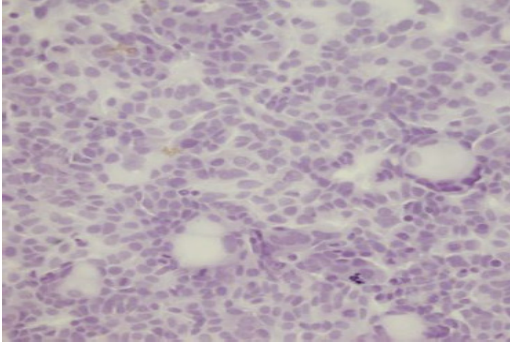
Adanya akumulasi dari protein p53 yang terjadi akibat adanya kerusakan DNA memegang peranan penting dalam *DNA repair*. Protein p53 akan merangsang keluarnya p21 yang dapat mengakibatkan terjadinya *cell cycle arrest*. *Cell cycle arrest* ini dapat memberikan waktu bagi sel untuk melakukan *DNA repair* akibat kerusakan, sehingga apabila *DNA repair* berhasil, sel dapat berproliferasi secara normal. Apabila kerusakan sel berlangsung hebat dan tidak dapat dilakukan *DNA repair* maka jalur apoptosis akan diaktifkan untuk mengeliminasi sel yang mengalami kerusakan. Apabila DNA repair secara normal tidak terjadi akibat terjadinya mutasi dari gen p53 maka sel dapat berproliferasi secara abnormal dan dapat terjadi keganasan. Protein p53 dapat merangsang apoptosis dengan merangsang ekspresi dari gen pro-apoptosis seperti *Bax*, *Fas/Apo-1*, *Death Reseptor 5 (DR5)*, atau *Insulin Like Growth Fator-Binding Protein 3 (IGF-BP3)*, atau dengan merangsang ekspresi gen anti-apoptosis seperti *Bcl-2*, *cellular inhibitor of apoptosis protein-2 (c-IAP2)* dan *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein 1 (NAIP1)*. Jika Apoptosis tidak terjadi akibat mutasi dari gen p53 atau disregulasi dari interaksi *Fas-FasL* maka sel dapat berkembang ke arah keganasan. Aktivitas protein p53 sebagai supresor kanker dapat diturunkan atau dihambat oleh protein *Mdm2*, yaitu suatu ligase ubiquitin yang dapat memberi tanda untuk proteolisis yang mengakibatkan terjadinya degradasi dari protein p53 menjadi lebih cepat. Protein *Mdm2* juga memodifikasi aktivitas p53 akibat terikat pada domain transaktivasi p53 pada N-terminus dan transpor protein pada sitoplasma, jauh dari DNA nuklear, sehingga aktivitas protein p53 sebagai suatu faktor transkripsi tidak dapat dijangkau. Gen *Mdm2* itu sendiri juga diaktifkan oleh protein p53 sehingga dapat memberikan umpan balik negatif (*negative autoregulatory loop*) (Chen et al. 2000).

Tidak berfungsinya kontrol *checkpoint* yang mengakibatkan gagalnya respons penghentian siklus sel pada sel kanker juga dapat menjadi target potensial terapi antikanker (Abrahamson et al. 1995). Sel dengan kontrol *checkpoint* yang rusak lebih sensitif terhadap perubahan genotoksik atau kerusakan mikrotubular. Kontrol *checkpoint* berfungsi untuk memastikan bahwa kromosom tetap utuh dan tahap-tahap kritis siklus sel telah sempurna sebelum memasuki tahap selanjutnya (Alfred et al. 1997). Pengaturan *checkpoint* tersebut melibatkan aktivasi dan

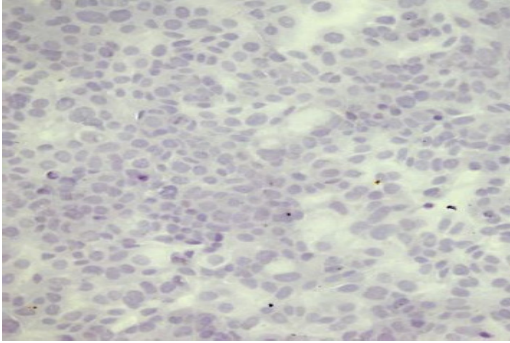
degradasi *cyclin*, aktivasi *cyclin dependent kinases (CDKs)*, *cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKIs)*. Interaksi antara ketiga kelas protein tersebut berperan mengontrol berbagai tahap siklus sel, mencegah sel ke tahap selanjutnya jika terjadi kerusakan DNA melalui mekanisme *checkpoint*, dan deregulasi proses tersebut berperan dalam pembentukan kanker (Dyson 1998).

Proses apoptosis dibedakan menjadi dua jalur, yaitu (1) jalur ekstrinsik atau *death receptor (DR)*, dan (2) jalur intrinsik atau jalur mitokondria. *DR pathway* dimulai dengan pengaktifan *tumour necrosis factor receptor (TNFR)*, yang meliputi Fas, DR 4, TNFR I, dan TNFR II. Fas menginduksi apoptosis melalui dua jalur. Jalur pertama berlangsung dengan mengikat ligan. Ikatan ligan mengaktifkan reseptor TNFRI dan Fas untuk menarik dan mengikat protein *death effector Fadd/Mort-1*. Ikatan Fadd/Mort-1 menarik *procaspase 8*. *Procaspase 8* diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu *caspace 8* dan dilepaskan kembali ke dalam sitosol. *Caspase 8* akan memecah dan mengaktifkan *caspace 3*. Sementara itu, jalur kedua berlangsung lewat jalur alternatif sinyal transduksi. Reseptor Fas berikatan dengan protein adapter yang akan mengaktifkan *mitogen activated protein (MAP) kinase* dan memicu kaskade fosforilasi yang meningkat pada aktivasi *c-Jun N terminal kinase (JNK)*. JNK yang teraktivasi memfosforilasi substrat, seperti c-Jun dan p53, serta menginduksi apoptosis lewat berbagai mekanisme, meliputi modifikasi dan pengaturan protein pada famili Bcl-2. Disamping itu, aktivasi apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik. Pada jalur tersebut, inisiasi apoptosis ditimbulkan oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler, seperti stres oksidatif, perubahan redoks, ikatan kovalen, peroksidase lipid. Bahan-bahan tersebut memberikan sinyal kepada mitokondria sehingga menyebabkan perubahan pada mitokondria yang dimulai dengan terbukanya membran bagian luar dan diikuti pembengkakan matriks dan hilangnya potensial membran yang menyebabkan keluarnya protein-protein mitokondria termasuk *cytochrome-c*. Apoptosis akan menghasilkan *apoptotic bodies* yang terdiri dari fragmen sisa-sisa sel yang akan difagositosis oleh sistem retikuloendotelial di sekitarnya.

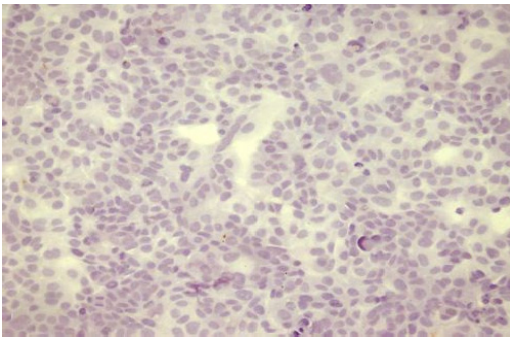
Proses apoptosis tersebut dikendalikan oleh dua perangkat gen yang berfungsi antagonistik yaitu memacu dan menghambat, termasuk gen yang memacu proses apoptosis yaitu p53, pRB, dan E2F, dimana protein gen-gen tersebut lebih berperan dalam siklus sel. Ketika terjadi kerusakan DNA maka p53 akan teraktivasi dan mengaktifkan p21 yaitu suatu *CDK Inhibitor*. P21 akan mengikat dan menginaktifkan kompleks CDK4 yang akan menyebabkan fosforilasi Rb terhambat dan pelepasan faktor transkripsi E2F terhenti, sehingga siklus sel terhenti pada tahap G1-S. Saat siklus sel terhenti, DNA mempunyai kesempatan untuk memperbaiki diri sebelum memasuki tahap pembelahan selanjutnya. Jika kerusakan DNA berat dan tidak dapat direparasi maka sel akan memasuki jalur apoptosis. Kompleks E2F dengan pRB merupakan kompleks stabil untuk mengaktifkan berbagai promoter dalam sintesis DNA. Pada kondisi tanpa adanya sinyal pertumbuhan, pRB dalam keadaan hipofosforilasi.



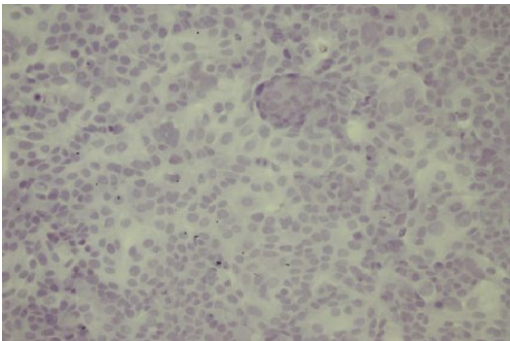
Gambar 1. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



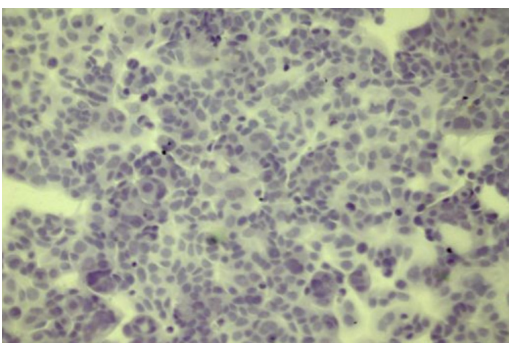
Gambar 2. Hasil *imunostaining* ekspresi p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



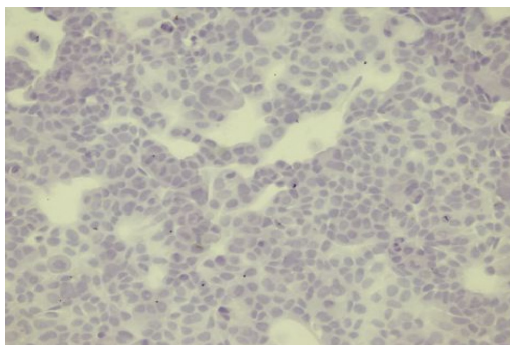
Gambar 3. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 62,50 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



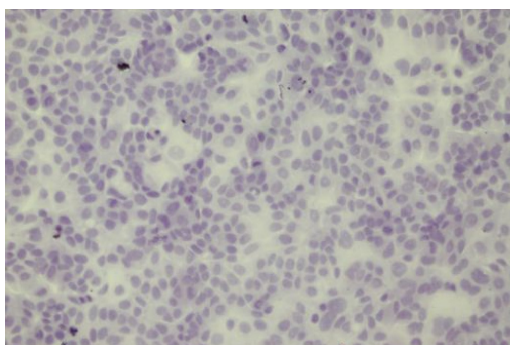
Gambar 4. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 0 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



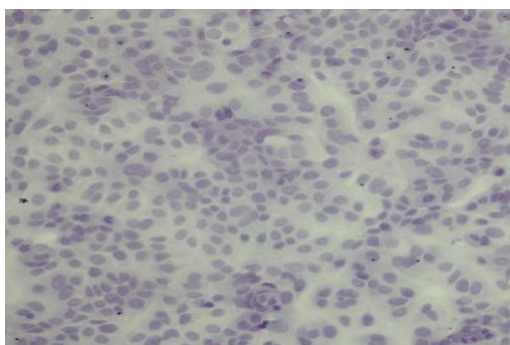
Gambar 5. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 1,95 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



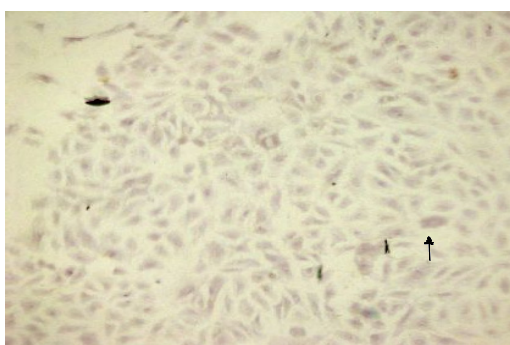
Gambar 6. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 3,90 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



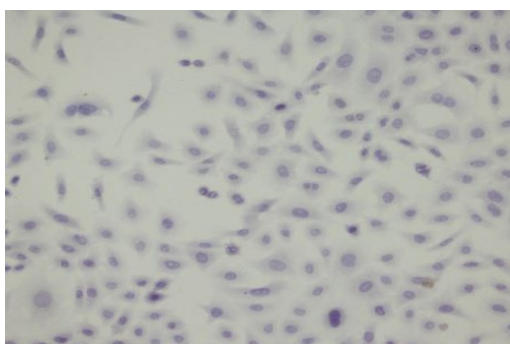
Gambar 7. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 7,81 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



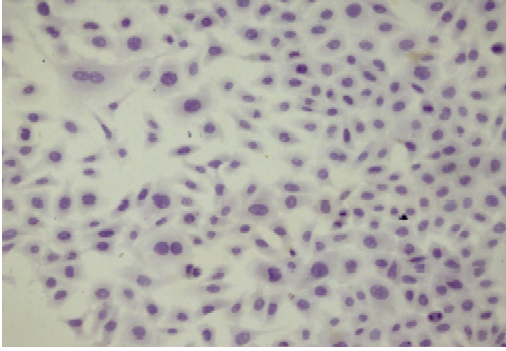
Gambar 8. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



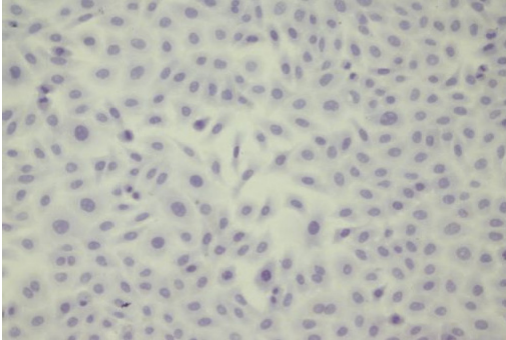
Gambar 9. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 0 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna inti kecokelatan.



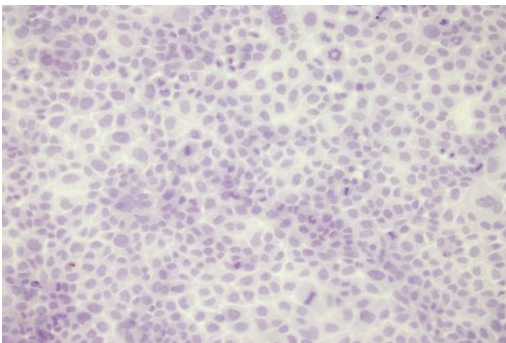
Gambar 10. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



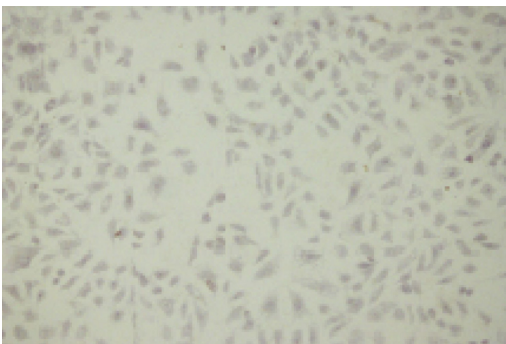
Gambar 11. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



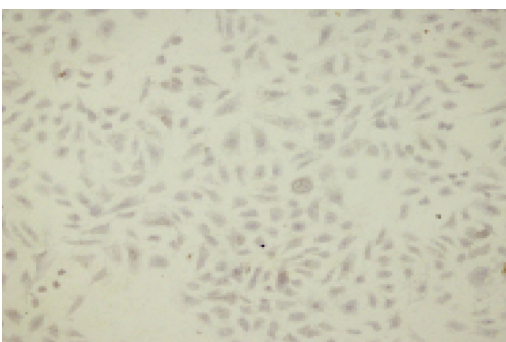
Gambar 12. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 62,50 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



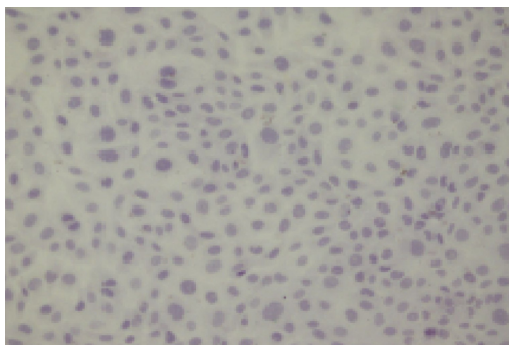
Gambar 13. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 125 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



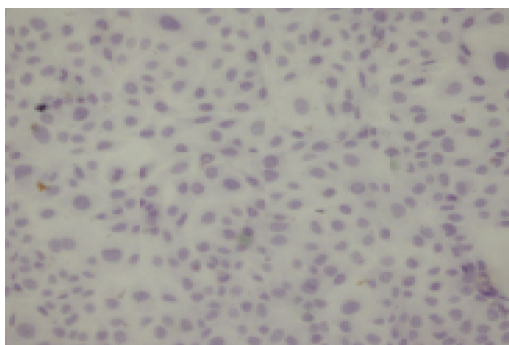
Gambar 14. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 0 µg/mL pada ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna inti kecokelatan.



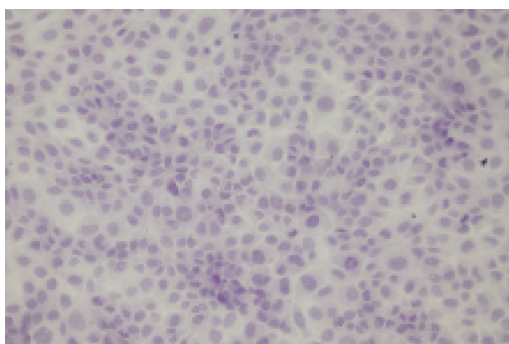
Gambar 15. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 3,90 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna kecokelatan, sedangkan sel negatif berwarna kebiruan.



Gambar 16. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 7,8 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.



Gambar 17. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.



Gambar 18. Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.

Pada keadaan terhipofosforilasi, pRB berikatan dengan E2F dan HDAC (*histone deacetylase*), serta menginaktifkan faktor transkripsi E2F. Ikatan antara pRB dengan HDAC dan E2F diatur oleh fosforilasi *serine/threonine*. E2F merupakan faktor transkripsi *cyclin E*, *cyclin A*, dan protein-protein lain yang terlibat dalam siklus sel. Fosforilasi tahap pertama oleh *cyclin D/CDK 4*, dalam stimulus *growth factor*, melepaskan HDAC dari kompleks HDAC-pRB-E2F. Fosforilasi tahap berikutnya dilakukan oleh *cyclin E/CDK 2* dan melepaskan E2F dari pRB. E2F yang dihasilkan akan menginduksi transkripsi gen, seperti *DNA polymerase* dan *thymidin kinase*, yang diperlukan untuk masuk ke dalam fase S.

Dari uraian tersebut dapat diketahui dengan jelas bahwa proses apoptosis dapat dipacu oleh berbagai faktor, baik dari jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik. Selain itu, siklus sel juga diatur dan dipengaruhi oleh berbagai macam enzim maupun protein yang berperan sebagai supresor gen kanker. Dengan demikian, penekanan ekspresi gen p53 mutan pada sel karsinoma payudara T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak bawang

dayak, menunjukkan penghambatan proliferasi sel terjadi akibat adanya apoptosis melalui jalur ekstrinsik atau intrinsik dan faktor-faktor yang mempengaruhinya meskipun proses apoptosis yang terjadi belum dapat ditentukan. Hal ini tentunya perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk mencari dan membuktikan faktor-faktor yang berpengaruh dalam penekanan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara. Pengembangan obat antikanker yang didasarkan pada regulasi siklus sel selanjutnya diarahkan pada penghambatan terjadinya proses pembelahan sel dan pemacu apoptosis. Dengan demikian, senyawa atau protein yang diberikan pada penderita dapat mencegah sintesis DNA dan mitosis, sehingga dapat menghentikan proliferasi sel kanker.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan

pada galur sel kanker payudara T47D secara in vitro. Tidak terdapat perbedaan potensi penekanan signifikan dari fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak terhadap penekanan ekspresi gen p53 mutan pada sel kanker payudara T47D.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrahamson JA, Lee JM, Bernstein A. 1995. Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by steel factor. *Mol Cell Biol* 15: 6953-6960.
- Albar ZA, Tjindarbumi D, Ramli. 2004. Protokol PERABOI 2003, Edisi I. Peraboi, Bandung.
- Alfred MC, Bruce DM. 1997. Cancer of the colon. In: Devita V (ed). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 5th edition. Lippincott-Raben, USA.
- Ashariati A. 2005. Pengelolaan medik penderita kanker. *Basic Science of Oncology*, Pertemuan Ilmiah Berkala Proyek Trigonum Plus XVIII. SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga-RSU Dr. Soetomo, Surabaya.
- Aulia N. 2003. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. UII, Yogyakarta.
- Chen F, Chang D, Goh M et al. 2000. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitor. *Cell Growth Differ* 11(5): 239-246.
- Dyson N. 1998. Genes and development, the regulation of E2F by pRB-family proteins. Cold Spring Harbor Laboratory Press. www.genesdev.org.
- Flaman JM, Frebourg T, Moreau V et al. 1995. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood and tumors. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3963-3967.
- Katzung BG. 2001. *Basic and clinical pharmacology*, Eighth edition. Mc Graw-Hill Companies, Philadelphia.
- Murti B. 1997. *Prinsip dan metode riset epidemiologi*. UGM Press, Yogyakarta.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250): 705-708.
- Smardova J, Pavlova S, Svitakova M et al. 2005. Analysis of p53 status in human cell lines using a functional assay in yeast: Detection of new non-sense p53 mutation in codon 124. *Oncol Rep* 14: 901-907.
- Tjindarbumi D. 2004. Penanganan kanker payudara masa kini dengan berbagai macam isu di Indonesia. *Indonesian Issues of Breast Cancer*. Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya.