

Sinergisme Fraksi Butanol Metabolit Sekunder Kapang Endofit 1.3.11 dengan Doxorubicin dalam Modulasi Daur Sel T47D dan MCF-7

SHIRLY KUMALA^{1*}, EDY MEIYANTO², MUTHI'IKAWATI², RIRIS ISTIGHFARI JENIE²

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jln. Srengseng Sawah, Jagakarsa,
Jakarta Selatan, 12640.

²Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC), Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara, Yogyakarta, 55281.

Diterima 26 November 2009, Disetujui 3 Maret 2010

Abstract: The synergic effects of *n*-butanolic fraction of secondary metabolite of endophytic fungus 1.3.11 (FB) and doxorubicin (Dox) on cell cycle regulation and the expression of Bcl-2 gene expression were investigated on MCF-7 and T47-D cells by flow cytometry and immunocytochemical techniques respectively. The results showed that after 12 hours of incubation period with FB at its IC₅₀ dose, MCF-7 cell cycle was inhibited at G₁ phase while Dox inhibited the cell cycle at G₂/M phase. Similar results were observed in T47-D cells when incubated with Dox and FB individually under the same treatment condition. Further treatment was then performed to these cells where both Dox and FB were combined at their IC₅₀ and ½ IC₅₀ dose and added to incubate with the cells over 12 hours period. Interestingly, the modified treatment combination showed that MCF-7 and T47-D cell cycle regulation were inhibited at G₂/M phase. Our immunocytochemical study also showed no significant inhibition suppression of Bcl-2 gene expression in both MCF-7 and T47-D cells when compared with their corresponding positive control after treatment with FB and Dox or both combined FB and Dox at IC₅₀ and ½ IC₅₀ dosage over 15 hours incubation.

Keywords: *n*-butanolic fraction, doxorubicin, T47D, MCF-7, cell cycle, flowcytometry.

PENDAHULUAN

KANKER payudara merupakan salah satu kanker penyebab kematian di dunia dengan insidensi 502.000 kasus per tahun⁽¹⁾. Di Indonesia, kasus kanker payudara mencapai 17,77% setelah kanker leher rahim 28,66%. Karena itu, pengembangan dan penemuan pengobatan kanker payudara perlu terus diupayakan. Pengobatan kanker payudara dengan agen kemoterapi, terutama doxorubicin, dapat menimbulkan resistensi sel kanker yang mengakibatkan kegagalan terapi kanker payudara⁽²⁾. Salah satu alternatif untuk mengatasi resistensi sel kanker payudara adalah kombinasi agen kemoterapi dengan agen kemopreventif sebagai upaya untuk meningkatkan efikasi agen kemoterapi sekaligus meminimalkan efek samping sehingga keberhasilan terapi dapat diperoleh⁽³⁾.

Salah satu bahan alam yang telah banyak diteliti sebagai agen kemopreventif adalah buah

Makassar (*Brucea javanica* (L.) Merr.). Berbagai metabolit sekunder dan ekstrak dari *B. javanica* memperlihatkan aktivitas kemopreventif pada macam-macam sel kanker^(4,5,6,7,8). Penelitian Kumala pada 2005⁽⁹⁾ menunjukkan peluang pengembangan ekstrak supernatan hasil fermentasi kapang endofit dari buah *Brucea javanica* (L.) Merr. sebagai agen kemopreventif pada berbagai jenis sel kanker. Fraksi *n*-butanol (FB) dari supernatan hasil fermentasi kapang endofit isolat 1.3.11 yang diisolasi dari *B. javanica* terbukti bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan T47D dengan IC₅₀ berturut-turut 48 dan 68 µg/ml dan menunjukkan sinergisme dengan doxorubicin dalam pemacuan apoptosis⁽¹⁰⁾. Dengan demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menelusuri mekanisme sinergisme tersebut.

Selain apoptosis, penghambatan daur sel merupakan target yang spesifik bagi agen antikanker⁽¹¹⁾. Pada penelitian ini akan ditelusuri pengaruh sinergisme kombinasi FB dengan doxorubicin pada program daur sel MCF-7 dan T47D sebagai model sel kanker payudara menggunakan metode *flowcytometry*.

* Penulis korespondensi, Hp. 08129026821
e-mail: fskumala@yahoo.com

Analisis ekspresi gen-gen yang terlibat dalam apoptosis akan memberi gambaran kemungkinan mekanisme yang memperantarai sinergisme kombinasi tersebut, sehingga pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan modulasi ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dengan metode imunositokimia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data berupa mekanisme sinergisme modulasi daur sel dan ekspresi gen yang spesifik dari kombinasi FB-doxorubicin sehingga dapat dijadikan landasan ilmiah bagi aplikasinya untuk terapi kombinasi pada kanker payudara.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Isolat kapang endofit 1.3.11, sel T47D, sel MCF-7, doxorubicin. Media fermentasi: *potato dextrose yeast extract* (PDY), *yeast extract* (Difco). Media kultivasi kapang: *potato dextrose agar* (PDA) (Oxoid), *potato dextrose broth* (PDB) (Oxoid). Bahan untuk ekstraksi: *n*-butanol *p.a.*, air suling, Na₂SO₄ anhidrat (Sigma), kertas saring (Whatman) (Sigma), asam asetat (Merck). Bahan untuk kultur sel: sel kanker payudara, digunakan jenis MCF-7 dan T47D, diperoleh dari Koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi, UGM. MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma*⁽¹²⁾ dan menunjukkan adanya diferensiasi pada jaringan epitel *mammae* termasuk diferensiasi pada sintesis estradiol. Sel kanker payudara T47D merupakan *ductal carcinoma* yang mempunyai morfologi seperti sel epitel yang diambil dari jaringan payudara. Sel ini mengekspresikan ER- β ⁽¹²⁾, dibuktikan dengan adanya respons peningkatan proliferasi sebagai akibat pemaparan 17 β -estradiol⁽¹³⁾. Media kultur sel: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS *qualified*, Gibco® 26140, Invitrogen TM USA) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco® 15140, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, 14072, USA). Pelarut: digunakan dimetilsulfoksida (DMSO) (minimum 99,5% *pro GC*, Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2%. Selain bahan-bahan di atas juga digunakan tripsin-EDTA 0,025% (Gibco® 25200, Invitrogen, Canada) untuk membantu melepas sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*. Bahan untuk *flowcytometry*: pereaksi propidium iodida (PI): 7% triton X (triton X-100 *for GC*, E.Merck, 64271, Darmstadt, Germany), 0,2% RNase (diperoleh dari *Laboratory of Animal Sciences*, NAIST, Jepang), 5% PI (minimum 95% (HPLC), Sigma, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, 63178, USA) 0,1 mg% dalam PBS, dilarutkan dengan PBS hingga 100%. Bahan untuk uji imunositokimia: metanol (E.Merck, Darmstadt, Germany), antibodi primer terhadap Bax (Sigma anti-

Bax developed in rabbit, IgG fraction antiserum, Sigma Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA) dan Bcl-2 (Dako cytometry, Dako Denmark, Dk 2600, Denmark), *universal detection kit* (streptavidin-HRP, antibodi sekunder terbiotinilasi, serum kuda/*blocking serum*) (*Ultravision plus detection system*, Ref TP 125-HLX, Runcorn, Cheshire, WA71PR, UK; Novostain *universal detection kit* NCL-RTU, Novocastra Lab Ltd., Newcastle NE12 8EW, UK). Bahan kimia lain: etanol teknis, air suling ganda. Jika tidak dikatakan lain, bahan-bahan yang digunakan berderajat *pro analisis*.

METODE. Tahap pelaksanaan. Fermentasi. Isolat kapang endofit diremajakan dengan menggunakan medium PDA (*potato dextrose agar*) dan PDB (*potato dextrose broth*) dikombinasikan dengan *yeast extract*. Kapang endofit dalam medium PDA yang berumur 5–7 hari diambil menggunakan *cor box*. Sebanyak 5 *cor box* dimasukkan ke dalam 50 ml medium fermentasi cair PDY (*potato dextrose yeast extract*). Fermentasi dilakukan menggunakan inkubator dengan goyangan melingkar pada kecepatan 130 rpm selama 14 hari pada suhu 27°C. Biomassa sel dipanen menggunakan sentrifuga berpendingin pada 2000 rpm selama 20 menit pada suhu minus 4°C (modifikasi Cheepta⁽¹⁴⁾). Supernatan digunakan untuk uji sitotoksitas.

Ekstraksi. Supernatan yang diperoleh dari pemisahan dengan sentrifugasi metabolit sekunder dicek pH-nya dan diatur menjadi pH 3–4 menggunakan asam asetat 1 M. Supernatan diekstraksi dengan *n*-butanol, dilakukan sekuensial sebanyak 3 kali kemudian masing-masing ekstrak disatukan dan ditambahkan Na₂SO₄ anhidrat. Setelah didiamkan selama 30 menit, dilakukan penyaringan menggunakan kertas Whatman. Selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada tangas air dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak dipindahkan ke dalam botol kecil dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kering *n*-butanol.

Pembuatan larutan uji. Fraksi *n*-butanol (FB) dilarutkan dalam DMSO dan dibuat stok, kemudian diencerkan dengan media kultur hingga konsentrasi yang diinginkan. Doxorubicin yang telah tersedia dalam sediaan cair diencerkan dengan media kultur hingga konsentrasi yang diinginkan. Konsentrasi FB dan doxorubicin yang digunakan mengacu pada IC₅₀ dan CI yang diperoleh dari penelitian tahun I. Pekerjaan ini dilakukan di dalam kabinet *laminar air flow* (LAF). Doxorubicin dibuat dalam seri konsentrasi menggunakan media kultur. Uji kombinasi antara ekstrak dan agen kemoterapi menggunakan konsentrasi IC₅₀ yang diperoleh dari uji sitotoksik masing-masing senyawa tersebut sebagai agen tunggal.

Pengamatan daur sel dengan flowcytometry. Sel sebanyak 10⁶ sel/sumuran didistribusikan ke dalam

lempeng 6 sumur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk pengadaptasian sel. Sel diberi perlakuan dan diinkubasi kembali selama 12 dan 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifuga 1,5 ml. Setelah itu, media yang mengandung suspensi sel yang terlepas tersebut disentrifuga (2000 rpm, 3 menit), dan supernatan dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya ditambahkan PBS, dan PBS ditransfer ke dalam tabung sentrifuga yang sama dari satu perlakuan, kemudian disentrifuga dan supernatan kembali dibuang. Tahap ini diulangi sekali lagi, kemudian sel dipanen dengan tripsin-EDTA. Hasil panen sel ditransfer ke dalam tabung sentrifuga yang sama dan disentrifuga (2000 rpm, 30 detik). Sisa panen sel yang masih berada dalam sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifuga kembali, lalu PBS dibuang. Endapan sel di dalam tabung sentrifuga selanjutnya dicuci dengan PBS dingin dan ditambahkan pereaksi PI. Tabung sentrifuga dibungkus aluminium foil dan diinkubasi di dalam tangas air 37°C selama 10 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam *flowcyto-tube* dan langsung dibaca dengan *flowcytometer*.

Pengamatan ekspresi gen dengan imunositokimia dengan antiapoptosis Bcl-2. Sel dengan jumlah 5×10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam lempeng 24 sumur yang telah dilapisi *coverslip* pada bagian dasarnya, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk pengadaptasian sel. Sel diberi perlakuan dan diinkubasi kembali selama 8 dan 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci PBS kemudian ditambahkan metanol dingin dan diinkubasi di dalam *freezer* -4°C selama 10 menit. Setelah itu metanol dibuang dan *coverslip* yang memuat sel diletakkan pada *dish* bersih yang dialasi dengan tisu basah untuk menjaga kondisi tetap lembab. Sel yang telah difiksasi dengan metanol kemudian dicuci dengan air suling 2 kali dan diinkubasi dalam larutan hidrogen peroksidase selama 10 menit. Selanjutnya, sel ditetesi dengan *prediluted blocking serum* dan diinkubasi 10 menit, ditambahkan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (Bcl-2) dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah dicuci dengan PBS, sel ditetesi dengan antibodi sekunder (*biotinylated universal secondary antibody*) dan kembali diinkubasi selama 10 menit. Sel dicuci lagi dengan PBS, kemudian ditambahkan pereaksi yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase dan diinkubasi 10 menit. Sel dicuci kembali dengan PBS dan ditetesi dengan larutan DAB serta diinkubasi 10 menit, kemudian dicuci dengan air suling. Sel ditetesi dengan larutan *Mayer-Haematoxylin* dan diinkubasi 3 menit, selanjutnya sel kembali dicuci dengan air suling. *Coverslip* diangkat dan dicelupkan ke dalam xylol, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol. Setelah kering, *coverslip* diletakkan di atas kaca obyek dan ditetesi

dengan lem (*mounting media*). *Coverslip* ditutup dengan *slide* kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

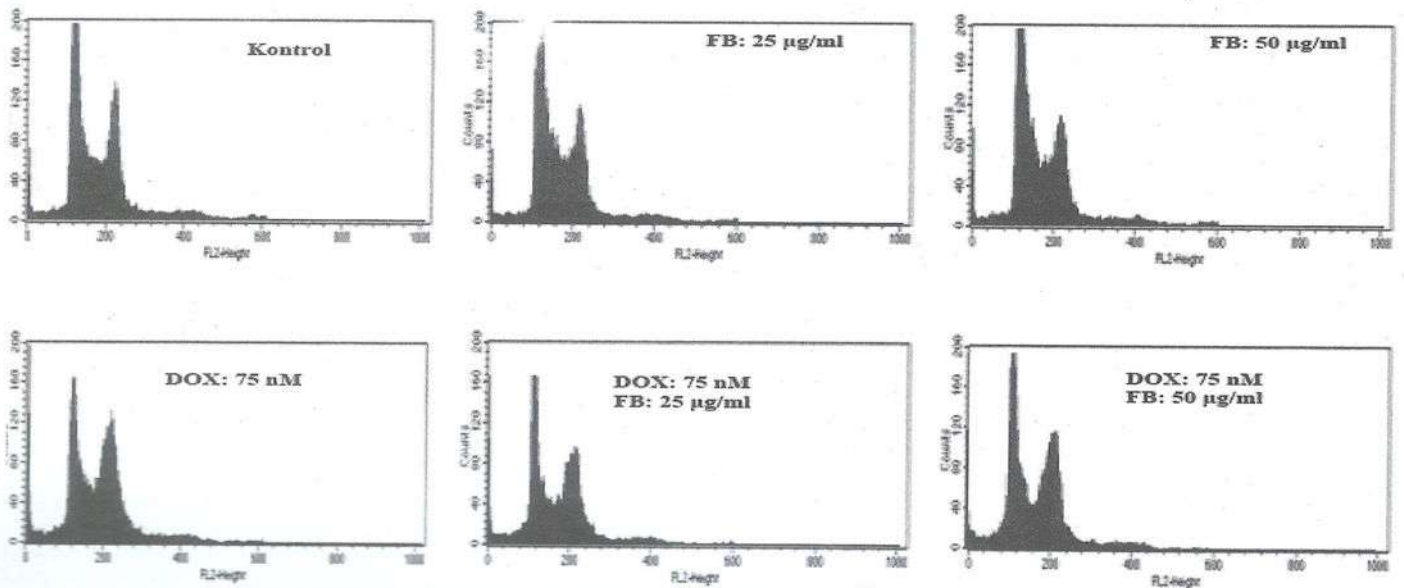
HASIL DAN PEMBAHASAN

Modulasi daur sel pada perlakuan terhadap sel MCF-7. Penghambatan sel MCF-7 dengan berbagai perlakuan pada inkubasi 12 jam disajikan pada Gambar 1. Sel MCF-7 diberi perlakuan doxorubicin (Dox), FB, dan kombinasi keduanya pada berbagai konsentrasi. Sel dicuci dengan PBS dingin, disentrifuga, kemudian ditambahkan pereaksi PI. Analisis dilakukan dengan program *Cell Quest*. Pada inkubasi 12 jam, perlakuan FB menunjukkan penghambatan pada fase G_1 , sementara perlakuan Dox menunjukkan penghambatan pada fase G_2/M . Kombinasi Dox $\frac{1}{2} IC_{50}$ (75 nM) dan FB baik pada $\frac{1}{2} IC_{50}$ (25 $\mu g/ml$) maupun pada nilai IC_{50} (50 $\mu g/ml$) menunjukkan kecenderungan penghambatan pada fase G_2/M .

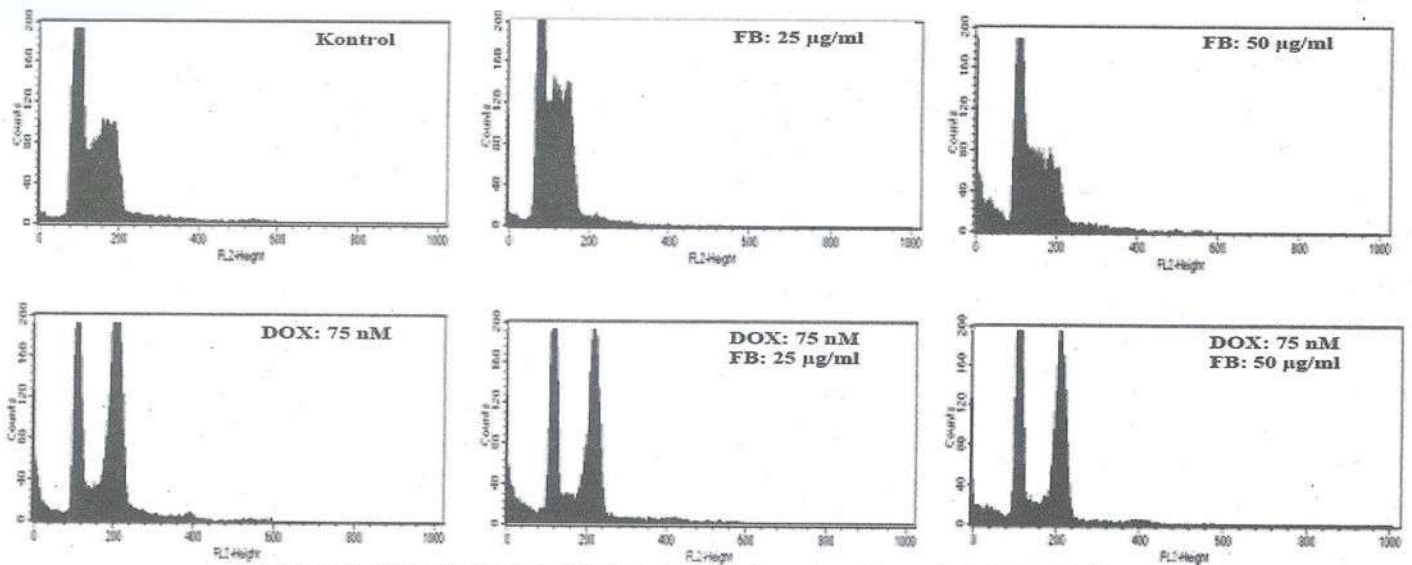
Penghambatan sel MCF-7 dengan berbagai perlakuan pada inkubasi 24 jam disajikan pada Gambar 2. Sel diberi perlakuan Dox, FB, dan kombinasi keduanya pada berbagai konsentrasi. Sel dicuci dengan PBS dingin, disentrifuga, kemudian ditambahkan pereaksi PI. Analisis dilakukan dengan program *Cell Quest*. Pada inkubasi 24 jam, perlakuan FB menunjukkan penghambatan pada fase G_1 dan induksi apoptosis, sementara perlakuan Dox menunjukkan penghambatan pada fase G_2/M . Kombinasi Dox $\frac{1}{2} IC_{50}$ (75 nM) dan FB baik pada $\frac{1}{2} IC_{50}$ (25 $\mu g/ml$) maupun pada nilai IC_{50} (50 $\mu g/ml$) menunjukkan kecenderungan penghambatan pada fase G_2/M dan induksi apoptosis.

Berdasarkan gambaran histogram DNA sel MCF-7 (Tabel 1) dengan perlakuan Dox, FB, dan kombinasi keduanya diperoleh hasil bahwa perlakuan tunggal Dox pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$ (75 nM) menginduksi terjadinya G_2/M *arrest*, baik pada inkubasi 12 jam maupun 24 jam (Gambar 1 dan 2, serta Tabel 1). Perlakuan tunggal FB pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$ (25 $\mu g/ml$) dan IC_{50} (50 $\mu g/ml$) menginduksi G_1 *arrest*, baik pada inkubasi 12 jam maupun 24 jam. Pada inkubasi 24 jam perlakuan FB tunggal 50 $\mu g/ml$ mampu menginduksi terjadinya apoptosis sebesar 22%.

Hal yang menarik adalah ketika sel MCF-7 diinkubasi dengan kombinasi Dox-FB. Pada inkubasi selama 12 jam, perlakuan kombinasi belum mampu menginduksi apoptosis, namun ketika inkubasi dilanjutkan hingga 24 jam terjadi akumulasi sel pada fase sub G_1 yang mengindikasikan kenaikan apoptosis. Pada kondisi tersebut, selain terjadi G_2/M *arrest* yang dominan, sel juga mengalami induksi apoptosis sebesar 33% dan meningkat ketika dikombinasi dengan FB IC_{50} (70 $\mu g/ml$), yaitu sebesar 40%. Sementara itu, ketika



Gambar 1. Analisis daur sel MCF-7 dengan *flowcytometry* pada inkubasi 12 jam.



Gambar 2. Analisis daur sel MCF-7 dengan *flowcytometry* pada inkubasi 24 jam.

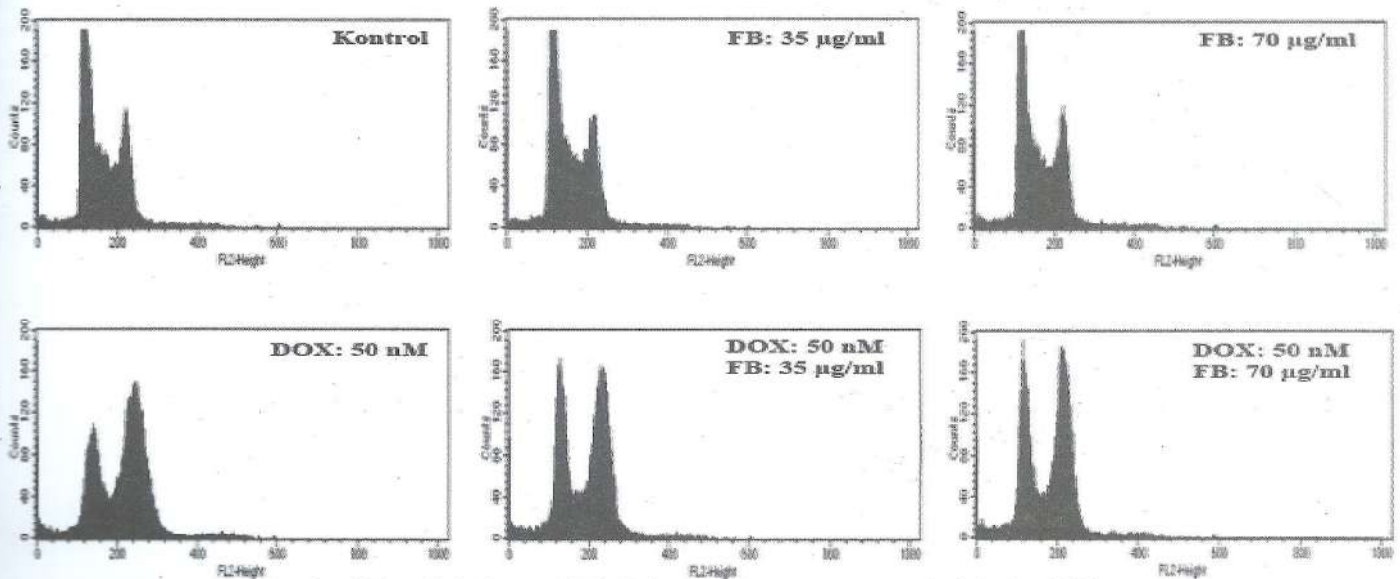
mendapat perlakuan tunggal Dox $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (75 nM) hanya sebesar 24%. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi Dox-FB menginduksi apoptosis pada sel MCF-7.

Modulasi daur sel pada perlakuan terhadap sel T47D. Penghambatan sel T47D dengan berbagai perlakuan pada inkubasi 12 jam disajikan pada Gambar 3. Sel diberi perlakuan Dox, FB, dan kombinasi

keduanya pada berbagai konsentrasi. Sel dicuci dengan PBS dingin, disentrifuga, kemudian ditambahkan pereaksi PI. Analisis dilakukan dengan program *Cell Quest*. Pada inkubasi 12 jam, perlakuan FB menunjukkan penghambatan pada fase G₁, sementara perlakuan Dox menunjukkan penghambatan pada fase G₂/M. Kombinasi Dox $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (50 nM) dan FB baik

Tabel 1. Distribusi sel MCF7 pada fase-fase daur sel setelah perlakuan berbagai konsentrasi Dox, FB, dan kombinasi keduanya.

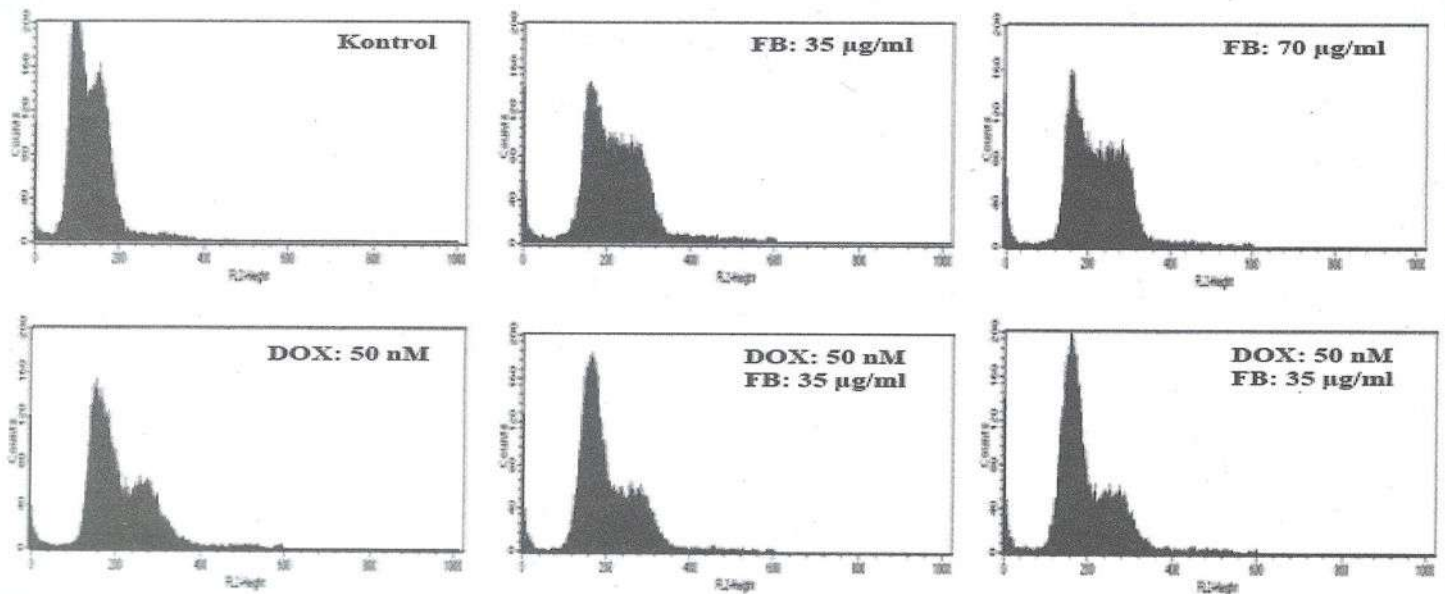
Perlakuan	Inkubasi (jam)	Konsentrasi	Sub G1 (apoptosis) (%)	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Poliploidi (%)
Kontrol	12	-	4,25	41,61	22,16	25,23	7,73
	24	-	10,12	48,41	15,62	23,36	3,23
FB	12	25 µg/ml	3,44	48,43	21,90	21,44	5,90
		50 µg/ml	4,09	46,75	20,47	23,07	6,64
	24	25 µg/ml	8,18	44,60	24,75	20,61	3,05
		50 µg/ml	22,65	39,73	19,07	15,74	3,72
Doxorubicin	12	75 nM	10,01	25,99	18,62	41,47	4,96
	24	75 nM	24,86	22,79	4,94	43,84	4,02
Kombinasi Dox-FB	12	75 nM : 25 µg/ml	11,60	28,09	16,60	39,58	5,23
		75 nM : 50 µg/ml	10,33	29,27	19,48	36,86	5,22
	24	75 nM : 25 µg/ml	33,56	25,88	3,90	34,12	2,82
		75 nM : 50 µg/ml	40,28	24,97	5,48	28,04	1,51

**Gambar 3. Analisis daur sel T47D dengan flowcytometry pada inkubasi 12 jam.**

pada $\frac{1}{2}$ IC_{50} (35 µg/ml) maupun pada nilai IC_{50} (70 µg/ml) menunjukkan kecenderungan penghambatan pada fase G_2/M .

Penghambatan sel T47D dengan berbagai perlakuan pada inkubasi 24 jam disajikan pada Gambar 4. Sel diberi perlakuan Dox, FB, dan kombinasi keduanya pada berbagai konsentrasi. Sel dicuci dengan PBS dingin, disentrifuga, kemudian ditambahkan pereaksi

PI. Analisis dilakukan dengan program *Cell Quest*. Pada inkubasi 24 jam, perlakuan FB menunjukkan penghambatan pada fase G_1 ; perlakuan Dox juga menunjukkan penghambatan pada fase G_1 . Kombinasi Dox $\frac{1}{2}$ IC_{50} (50 nM) dan FB baik pada $\frac{1}{2}$ IC_{50} (35 µg/ml) maupun pada nilai IC_{50} (70 µg/ml) menunjukkan kecenderungan penghambatan pada fase G_1 dan sedikit induksi apoptosis.



Gambar 4. Analisis daur sel T47D dengan *flowcytometry* pada inkubasi 24 jam.

Tabel 2. Distribusi sel T47D pada fase-fase daur sel setelah perlakuan berbagai konsentrasi Dox, FB, dan kombinasi keduanya.

Perlakuan	Inkubasi (jam)	Konsentrasi	Apoptosis	G ₁	S	G ₂ /M	Poliploidi
Kontrol	12	-	0,05	44,99	27,40	23,71	4,99
	15	-	11,09	38,23	13,75	35,73	2,70
FB	12	35 µg/ml	0,04	44,37	24,19	28,33	4,37
		70 µg/ml	0,01	39,62	25,40	30,94	5,35
	15	35 µg/ml	15,07	37,58	21,43	23,85	2,96
		70 µg/ml	15,05	32,36	19,47	31,21	2,74
Doxorubicin	12	50 nM	0,01	24,91	11,29	60,03	4,38
	15	50 nM	22,68	45,25	9,45	20,63	2,55
Kombinasi	12	50 nM : 35 µg/ml	0,02	31,13	9,17	55,29	5,00
		50 nM : 70 µg/ml	0,03	27,37	11,27	58,17	3,81
	15	50 nM : 35 µg/ml	17,04	49,77	13,70	18,07	2,01
		50 nM : 70 µg/ml	20,25	49,77	11,59	17,10	1,79

Gambaran histogram DNA sel T47D (Tabel 2) dengan perlakuan Dox, FB, dan kombinasi keduanya menunjukkan hasil yang berbeda dari sel MCF-7. Perlakuan tunggal FB pada konsentrasi yang dicobakan memberikan hasil yang tidak berbeda jauh dari kontrol sel, baik pada inkubasi 12 jam maupun 15 jam. Sedangkan perlakuan tunggal Dox $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (50

nM) menunjukkan hasil yang berbeda, yaitu ketika diinkubasi selama 12 jam terjadi G₂/M *arrest* namun ketika diinkubasi selama 15 jam terjadi G₁/*arrest* dan induksi apoptosis, masing-masing sebesar 45% dan 22%. Fenomena pada Dox ini juga tampak pada perlakuan kombinasi Dox-FB sebagaimana tersaji pada Gambar 3 dan 4 serta Tabel 2. Berdasarkan data yang

diperoleh di atas terlihat bahwa perlakuan kombinasi Dox-FB menghambat siklus sel dengan profil yang tidak berbeda jauh dengan perlakuan tunggal Dox.

Berdasarkan hasil *flowcytometry* tersebut, tampak jelas terjadi induksi apoptosis pada perlakuan kombinasi Dox-FB. Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa kombinasi FB dan Dox akan meningkatkan kejadian apoptosis pada sel MCF-7 dan T47D⁽¹⁰⁾. Dengan demikian, tampaknya induksi apoptosis oleh perlakuan kombinasi berjalan spontan tanpa melalui modulasi daur sel. Hal ini dapat terjadi melalui modulasi ekspresi protein *pro-* dan *anti-apoptosis*, misalnya ekspresi Bax dan Bcl-2. Sebab itu, untuk lebih mengetahui ekspresi gen yang berpengaruh pada sinergisme Dox-FB dilakukan uji imunositokimia menggunakan antibodi protein yang berperan dalam apoptosis, yaitu Bcl-2. Diharapkan melalui hasil pengecatan tersebut akan dapat dijelaskan mekanisme molekuler yang memperantarai efek kombinasi Dox-FB.

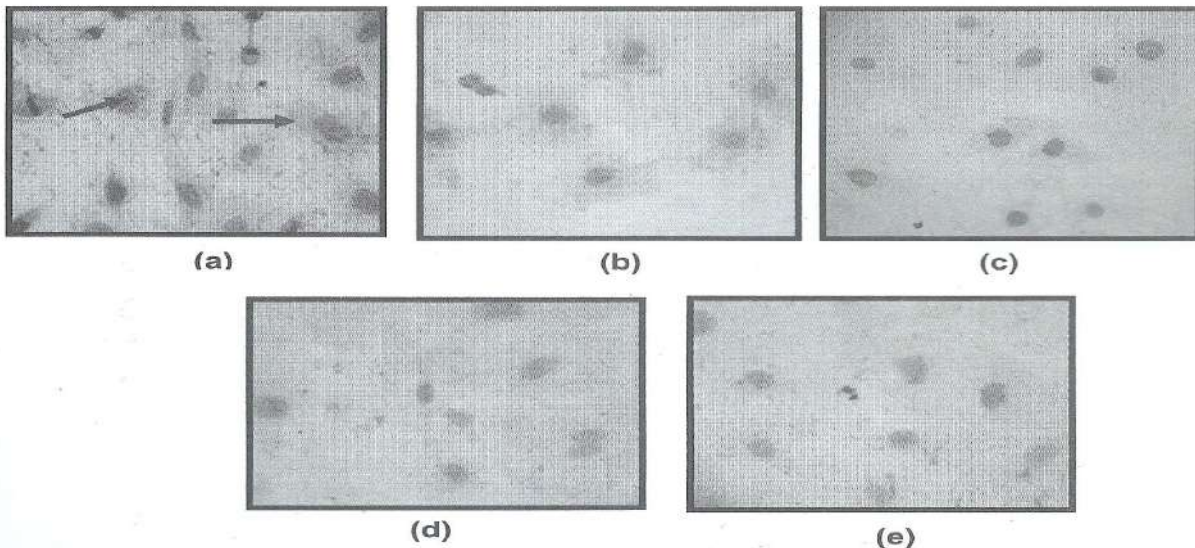
Pengaruh perlakuan terhadap ekspresi Bcl-2. Secara kualitatif, hasil pengecatan imunositokimia dengan antibodi Bcl-2 memperlihatkan adanya perbedaan level ekspresi Bcl-2 antara kontrol sel dan antibodi spesifik Bcl-2 dibandingkan dengan perlakuan fraksi *n*-butanol (FB) *Brucea javanica*, doxorubicin, serta kombinasinya disajikan pada Gambar 5. Hasil

imunositokimia pengamatan ekspresi Bcl-2 pada sel T47D disajikan pada Gambar 6.

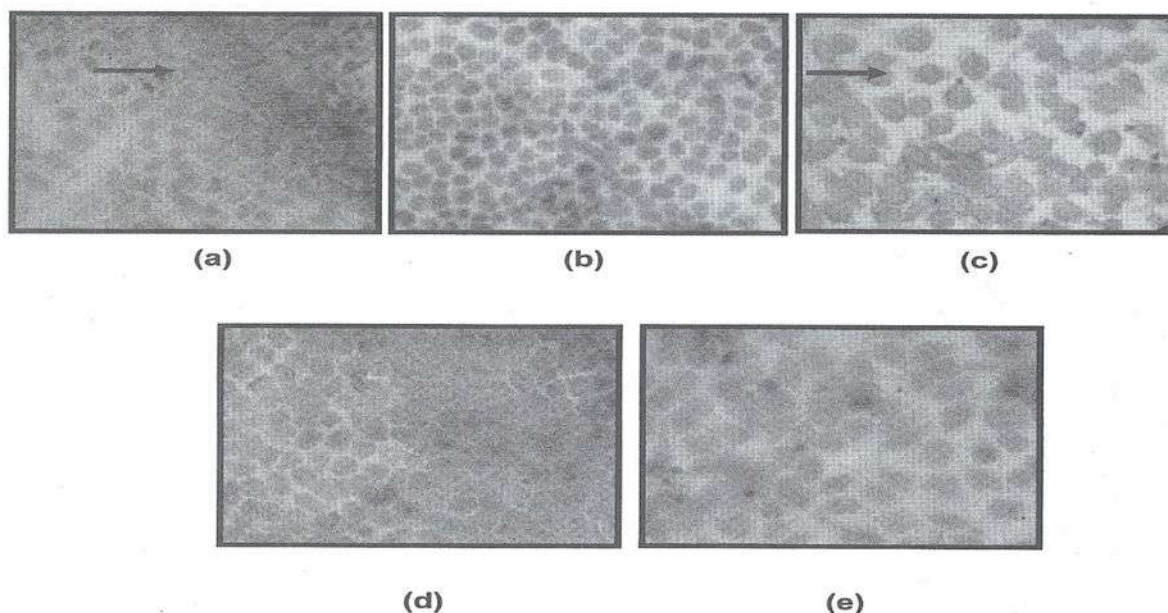
Dari hasil pengamatan ekspresi protein Bcl-2 pada sel MCF-7 dan T47D terlihat bahwa pada masing-masing perlakuan, yaitu fraksi butanol, doxorubicin, dan kombinasinya, tidak memperlihatkan perbedaan signifikan (Gambar 6). Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh pemberian doxorubicin, fraksi *n*-butanol ekstrak *Brucea javanica*, serta kombinasi ekstrak dengan doxorubicin terhadap ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7 dan T47D, sebaiknya dilakukan pengamatan terhadap adanya ekspresi protein regulator apoptosis lainnya seperti p53, Bax, dan Caspase.

SIMPULAN

Kombinasi doxorubicin (Dox) $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (75 nM) dan fraksi *n*-butanol (FB) baik pada $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (25 µg/ml) maupun pada nilai IC₅₀ (50 µg/ml) menunjukkan kecenderungan penghambatan pada fase G₂/M dan induksi apoptosis. Dari hasil pengamatan ekspresi protein Bcl-2 pada sel MCF-7 dan T47D terlihat bahwa pada masing-masing perlakuan yaitu fraksi *n*-butanol, doxorubicin, dan kombinasinya tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan.



Gambar 5. Efek perlakuan doxorubicin, fraksi *n*-butanol, dan kombinasinya pada sel MCF-7. Kontrol positif dengan pengecatan anti Bcl-2 menunjukkan ekspresi Bcl-2 dengan warna coklat pada sitoplasmanya (a). Kontrol negatif tanpa penambahan antibodi primer, anti Bcl-2 menunjukkan warna biru muda pada sitoplasma (b). perlakuan doxorubicin $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (c), fraksi butanol $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (d), dan kombinasinya (e) dengan waktu inkubasi 15 jam memperlihatkan penurunan Bcl-2 yang signifikan dibandingkan dengan kontrol sel positif. pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 500 kali.



Gambar 6. Efek perlakuan doxorubicin, fraksi butanol, dan kombinasinya pada sel T47D. Kontrol positif dengan pengecatan anti Bcl-2 menunjukkan ekspresi Bcl-2 dengan warna coklat pada sitoplasmanya (a). Kontrol negatif tanpa penambahan antibodi primer, anti Bcl-2 menunjukkan warna biru muda pada sitoplasma (b). perlakuan doxorubicin $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (c), fraksi butanol $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (d), dan kombinasinya (e) dengan waktu inkubasi 15 jam memperlihatkan penurunan Bcl-2 yang signifikan dibandingkan dengan kontrol sel positif. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 500 kali.

SARAN

Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh pemberian doxorubicin, fraksi ekstrak *Brucea javanica*, serta kombinasi ekstrak dengan doxorubicin terhadap kejadian apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 dan T47D, sebaiknya dilakukan pengamatan terhadap adanya ekspresi protein p53, Bax, dan Caspase.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Ditjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Bersaing dengan Nomor : 029/SP2H/PP/DP2M/IV/2009.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization, Fact sheet No. 297, Cancer. 2006.
2. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Xue HY, Babakhanian K, Wu XY. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *The J of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006. 317(3):1372-81.
3. Prakash J, Gupta SK. Natural products for chemoprevention. *Indian J of Med and Paed Onc*. 2004.25(3):37-53.
4. Rahman S, Fukamiya N, Tokuda H, Nishino H, Tagahara K, Lee K, Okano M. Three new quassinoid derivatives and related compounds as antitumor promoters from *Brucea javanica*. *Bull of Chem Soc of Japan*. 1999:72.
5. Cuendet M, Christov K, Lantvit DD, Deng Y, Hedayat S, Helson L, McChesney JD, Pezzuto JM. Multiple myeloma regression mediated by bruceantin. *Clinical Cancer Research*. 2004(10):1170-79.
6. Mata-Greenwood E, Cuendet M, Sher D, Gustin D, Stock W, Pezzuto JM. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G₁ arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia*. 2002.16(11):2275-84.
7. Lau FY, Chui CH, Roberto G, Stanton HLK, Kan KL, Gregory YMC, Raymond SMW, Ivy TNT, Cheng CH, Thomas SKW, Albert SCC, Johnny COT. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of *Brucea javanica* extract on human carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2005.16(6):1157-62.
8. Ryoho GTK, Xuan YB, Yasuda S, Shimada K., Nagai S, Ishihama H. Growth inhibition of the emulsion from *Brucea javanica* to cultured human carcinoma cells. 1994.21(14):2421-25.

9. Kumala S. Isolasi dan penapisan mikroba endofit tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. serta uji sitotoksik metabolit sekunder terhadap beberapa sel kanker secara *in vitro* [Disertasi]. Jakarta: Program Studi Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. 2005. hal. 55-101.
10. Kumala S, Septisetyani EP, Meiyanto E. Fraksi *n*-butanol supernatan fermentasi kapang endofit (isolat 1.3.11) buah Makasar meningkatkan efek apoptosis doxorubicin pada sel MCF-7. *Indon J Pharm (MFI)*.2009.20(2):42-7.
11. Meiyanto E. Kurkumin sebagai obat kanker: menelusuri mekanisme aksinya. *Majalah Farmasi Indonesia*. 1999.10(4):224-36.
12. Anonim. MCF7 cell. *Medical dictionary*. 2000. Diambil dari www.wrongdiagnosis.com/medical/mcf7_cell.htm. Diakses bulan September 2008.
13. Zampieri L, Bianchi P, Ruff P, Arbuthnot P. Differential modulation by estradiol of *p*-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2002.22(4):2253-9.
14. Cheepthan N, Phay N, Hugashiyama, Fukushi E, Matsuura H, Mikawa T. Studies on antifungi antibiotic from *Ellisiodothis inguinamas* L1588-A8. *Thai J Biotechnol*. 1999.(Sep):37-45.