



Induksi Polifenol Mahkota Dewa dan Apoptosis Sel Kanker Paru Mencit Strain Balb/C: Analisis pada *Up-Regulation* Bax dan *Down-Regulation* Bcl-2

Theopilus W. Watuguly *, Tjahjono **, Martha Kaihena ***, Syahrani Wael ****

ABSTRACT

Mahkota Dewa polyphenol induction and apoptosis cell lung cancer in Balb/c strain mice analysis on up-regulation Bax and down-regulation Bcl-2

Background: This research is aimed to prove the role of Mahkota Dewa polyphenol in the up-regulation Bax and down-regulation in strain Balb/c mice which inducted with benzo(a)pyrene (BaP).

Method: Post test control group design with 30 strain Balb/c mice sample, aged 1-2 weeks, weighed 20-30 grams, healthy mice condition. All mice inducted with BaP and then randomized into 2 groups, which were the control group and the treatment group (polyphenol 50mg). The development of the lung carcinogenesis was observed by tissue surgery in the 8th, 17th and 26th week. The data collected include expression examination Bax and Bcl-2. The data analysis was conducted by Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and correlation test of Spearman's with significance degree of $p < \alpha$ (0.05).

Result: The oral administration of Mahkota Dewa polyphenol of 50 mg were significantly decreased the occurrence of lung carcinogenesis through decreasing of protein Bax and increasing Bcl-2 in treatment group in week 8, 17 and 26 ($p=0.000$). Protein Bax for the control group for week 8 were 4.04 ± 0.22 and 1.92 ± 0.10 in week 26, while the treatment group were 5.96 ± 0.32 and 4.68 ± 0.22 ($p=0.000$). Protein Bcl-2 for the control group for week 8 were 5.80 ± 0.32 and 9.64 ± 0.26 in week 26, while the treatment group were 5.12 ± 0.22 and 7.38 ± 0.21 ($p=0.000$). The Spearman correlation for Bax and Bcl-2 with significancy value of ($p=0.000$).

Conclusion: The administration of Mahkota Dewa polyphenol of 50 mg effectively increased Bax protein expression and decreased Bcl-2 protein expression in mice Balb/c.

Keywords: Polyphenol, Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl), protein Bax, protein Bcl-2, strain Balb/c mice, benzo(a)pyrene (BaP)

ABSTRAK

Latar belakang: Penelitian ini bertujuan membuktikan peran polifenol Mahkota Dewa dalam meningkatkan protein Bax dan menurunkan protein Bcl-2 pada mencit strain Balb/c hasil induksi Benzo(a)pyrene (BaP).

Metode: Post test only control group design dengan sampel 30 mencit strain Balb/c, umur 1-2 minggu, berat 20-30 gram, kondisi mencit sehat. Semua mencit diinduksi BaP kemudian hewan dirandomisasi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan polifenol 50 mg. Perkembangan karsinogenesis paru diamati dengan pembedahan jaringan pada minggu ke-8, 17 dan 26. Data dikumpulkan meliputi pemeriksaan ekspresi Bax dan Bcl-2. Analisis data dengan Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney dan uji korelasi Spearman dengan derajat kemaknaan $p < \alpha$ (0,05).

Hasil: Pemberian oral polifenol Mahkota Dewa sebesar 50 mg secara bermakna memperlihatkan peningkatan protein Bax dan penurunan protein Bcl-2 pada kelompok perlakuan pada minggu ke-8, 17 dan 26 ($p=0,000$). Protein Bax pada kelompok kontrol minggu ke-8 sebesar $4,04 \pm 0,22$ dan $1,92 \pm 0,10$ minggu ke-26, sedangkan kelompok perlakuan sebesar $5,96 \pm 0,32$ dan $4,68 \pm 0,22$ ($p=0,000$) sedangkan protein Bcl-2 pada kelompok kontrol minggu ke-8 sebesar $5,80 \pm 0,32$ dan $9,64 \pm 0,26$ minggu ke-26, sedangkan

* Program Pendidikan Biologi, Jurusan PMIPA FKIP dan Program Pendidikan Dokter Universitas Pattimura Ambon, Jl. Dr. Tamaela, Kampus Universitas Pattimura Ambon

** Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo 16-18 Semarang

*** Jurusan Biologi FMIPA dan Program Pendidikan Dokter Universitas Pattimura Ambon, Jl. Dr. Tamaela, Kampus Universitas Pattimura Ambon

**** Program Pendidikan Biologi, Jurusan PMIPA FKIP Universitas Pattimura Ambon, Jl. Dr. Tamaela, Kampus Universitas Pattimura Ambon

kelompok perlakuan sebesar $5,12 \pm 0,22$ dan $7,38 \pm 0,21$ ($p=0,000$). Hasil uji korelasi Spearman protein Bax dan protein Bcl-2 dengan nilai signifikansi ($p=0,000$).

PENDAHULUAN

Kanker paru merupakan penyebab utama dari kematian yang berkaitan dengan kanker di seluruh dunia,^{1,2} diperkirakan 29.500 kematian terjadi setiap tahun.³ Jumlah penderita kanker paru setiap tahun didiagnosis dan terus mengalami peningkatan baik di negara maju maupun negara berkembang.^{4,5} Kerentanan dan risiko kanker paru meningkat dengan penurunan kemampuan perbaikan (*repair*) DNA (terutama disertai dengan paparan rokok),^{6,7} dimana merokok tetap merupakan faktor risiko utama kanker paru,⁸ yang dikaitkan dengan 80-90% kasus,⁹ sekitar 90% pada pria dan 70% pada wanita.¹⁰

Operasi dan kemoterapi merupakan salah satu pilihan terapi untuk kanker paru, baik berupa terapi tunggal atau kombinasi dengan dan/atau radioterapi.¹⁰ Namun demikian, terapi untuk kanker stadium lanjut belum mampu meningkatkan angka harapan hidup secara bermakna.¹¹ Respon dan umur harapan hidup dari berbagai paduan kemoterapi memberikan hasil yang hampir sama dari tahun ke tahun.¹² Jenis *non small cell lung cancer* menunjukkan respon yang baik terhadap kemoterapi tetapi hasil akhirnya belum memuaskan,¹³ sedangkan untuk jenis *small cell lung cancer*, kemoterapi merupakan pilihan namun respons obyektif kemoterapi masih jauh dari harapan.¹² Oleh karena itu, diperlukan pendekatan lain yaitu mengendalikan kanker paru melalui tindakan pencegahan dari tanaman obat.

Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl) merupakan salah satu tanaman obat Indonesia yang banyak digunakan dan dijual di pasar bebas sebagai anti kanker. Mahkota Dewa telah diketahui memiliki efek antikanker dan penghambatan ini diduga berkaitan dengan peran polifenol. Berdasarkan analisis fitokimia, polifenol merupakan salah satu senyawa yang ditemukan pada Mahkota Dewa. Polifenol dapat mempengaruhi keseluruhan proses dari karsinogenesis dengan beberapa mekanisme. Secara khusus, polifenol turut menimbulkan perlawanan pada peristiwa tekanan oksidatif^{14,15} dan dalam proses ini, polifenol dapat berkontribusi dalam pencegahan awal dan menghambat perkembangan kanker. Berbagai penelitian ilmiah telah membuktikan bahwa polifenol pada obat tradisional dapat secara langsung memodulasi titik-titik yang berbeda dari proses apoptosis dan/atau ekspresi dari protein regulasi, seperti *down-regulation* ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xL, peningkatan ekspresi Bax dan Bak.^{16,17}

Simpulan: Pemberian polifenol Mahkota Dewa 50 mg efektif menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi protein Bax dan penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada mencit strain Balb/c.

Bax yang merupakan anggota proapoptosis famili Bcl-2, disisi lain, *up-regulation* ekspresi Bax dan *down-regulation* Bcl-2 dapat ditunjukkan selama proses apoptosis.¹⁸ Secara teori, proses apoptosis tidak hanya melibatkan aktivasi transkripsional Bax pada apoptosis, tetapi juga dalam perubahan dari Bcl-xL (anggota pro-apoptosis family Bcl-2)/rasio Bax, sehingga menunjukkan bahwa hubungan silang antara protein pro- dan anti-apoptosis merupakan salah satu faktor penting yang menentukan nasib suatu sel. Protein Bcl-2 berperan dalam menghambat apoptosis, tingginya ekspresi Bcl-2 berhubungan dengan kelangsungan hidup yang lebih baik. Penurunan Bcl-2 yang diperantarai *antisense* mengembalikan apoptosis pada sel-sel kanker paru¹⁹ dan oleh karena itu tampak sebagai suatu agen yang poten. Sedangkan protein Bax, suatu homolog dari Bcl-2, menyebabkan apoptosis.²⁰ Ekspresi berlebih Bcl-2 diketahui menghambat aktivitas pro-apoptosis dari Bax. Ekspresi Bax dihubungkan dengan peningkatan kelangsungan hidup rata-rata pada stadium IV kanker paru bukan sel kecil.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati peran polifenol Mahkota Dewa terhadap apoptosis sel melalui ekspresi protein Bax dan ekspresi protein Bcl-2 selama proses karsinogenesis paru dengan menggunakan model hewan percobaan di laboratorium. Penelitian dengan menganalisis petanda (*marker*) pada jalur apoptosis yang hasilnya dapat bermanfaat sebagai tindakan pencegahan kanker paru di masa depan.

METODE

Sebanyak 30 ekor mencit strain Balb/c berumur 1-2 minggu diadaptasi selama seminggu dilaboratorium percobaan hewan dengan cara dikandangkan secara steril dengan pencahayaan yang memadai. Induksi dilakukan dengan menggunakan karsinogen BaP (*Benzo[a]pyrene*). Induksi pertama dilakukan pada hari ke-1 dengan dosis 0,2 mL/0,025 cc. Induksi kedua pada hari ke-8 dengan dosis 0,4 mL/0,025 cc dan induksi ketiga pada hari ke-15 dengan dosis 0,8 mL/0,025 cc. Tiap anak mencit mendapatkan (menerima) induksi BaP secara subkutan pada regio subskapular dengan 0,1 mL suspensi konsentrasi B(a)P 0,2 mg yang telah dilarutkan dalam DMSO (dosis tunggal). Karsinogen digunakan dalam 1 jam setelah emulsifikasi. Setelah diinjeksi, mencit dibiarkan hidup dengan induknya, diberi air dan makanan secara *ad libitum* selama proses penyapihan. DMSO tidak bersifat toksik sehingga digunakan sebagai

larutan pengenceran dan dilarutkan dengan BaP (*inductor*).

Memasuki minggu ke-5, mencit strain Balb/c yang telah memasuki perkembangan hiperplasia, mencit dibagi dalam 2 kelompok secara random, dengan jumlah mencit sebanyak 15 ekor pada kelompok kontrol, yang tidak mendapat perlakuan polifenol sampai minggu ke-26 sedangkan kelompok perlakuan berjumlah 15 ekor yang mendapat polifenol MaDe secara oral dengan dosis 50 mg/kg/mencit/hari dari minggu ke-5 dan berlanjut sampai minggu ke-26.

Mencit dari 2 kelompok (kontrol dan perlakuan) diterminasi untuk pada minggu ke-8, ke-17 dan ke-26 untuk studi perkembangan stadium dengan interval waktu yang berbeda. Seluruh organ paru dieksisi dan dicuci dengan larutan 0,9% NaCl, dikeringkan dan difiksasi dengan larutan *formaldehyde buffer* 10% selama 24 jam, setelah itu kemudian siap untuk dibuat blok parafin. 5 lobus paru dipotong pada tiap *slide* ukuran 4 mikron dengan 4 potongan jaringan, kemudian pengamatan dilakukan.

Proses terakhir, masing-masing blok parafin dipotong setebal 4 mikron, dibuat preparat sediaan histopatologi untuk pemeriksaan imunohistokimia. Perhitungan jumlah sel yang positif mengekspresikan protein Bcl-2 dan protein bax, menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x pada 5 lapang pandang. Sitoplasma sel yang mengekspresikan protein akan memperlihatkan warna kecoklatan. Pengecatan IHC menggunakan antibodi yang dilabel enzim *horseradish peroxidase*. Antibodi tersebut akan terikat dengan protein spesifiknya. Pada sel yang mengekspresikan protein secara positif, enzim yang berlabel pada antibodi akan bereaksi dengan kromogen DAB menjadi substrat berwarna coklat, sebaliknya pada sel yang ekspresi negatif akan terlihat berwarna ungu. Pewarnaan imunohistokimia diberi skor sesuai dengan jumlah sel yang positif terwarnai tiap 100 sel yang dihitung. Imunoreaktivitas protein bax dan Bcl-2, caspase-3 dianggap sebagai negatif (0) ketika tidak terdapat pewarnaan; lemah/*weak* (1) ketika pewarnaan bersifat fokal dan agak intens; sedang/*moderate* (2) ketika sekitar dua per tiga sel cukup terwarnai; kuat/*strong* (3) ketika mayoritas sel (>dua per tiga) bernoda intens.²¹⁻²⁵

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk *mean*, median, modus dan simpang baku, selanjutnya dinilai memiliki sebaran normal atau tidak dengan menilai histogram dan *box plot* yang menggunakan uji normalitas Kolmogorov Smirnov. Analisis data pada penelitian ini selanjutnya menggunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Uji korelasi antara variabel

penelitian menggunakan uji Spearman. Data yang diperoleh secara statistik menggunakan SPSS *vers.*¹⁹

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Protein pro dan anti-apoptosis berperan penting dalam apoptosis, maka penelitian ini untuk melihat efek polifenol Mahkota Dewa dapat mempengaruhi ekspresi protein pro-apoptosis Bax serta anti-apoptosis Bcl-2 pada mencit Balb/c. Berdasarkan perhitungan insidensi hiperplasia dan displasi pada epitel bronkiolus, terdapat sebaran nilai yang dihitung dan diulang 5x pada daerah yang tidak sama kemudian dihitung rerata.

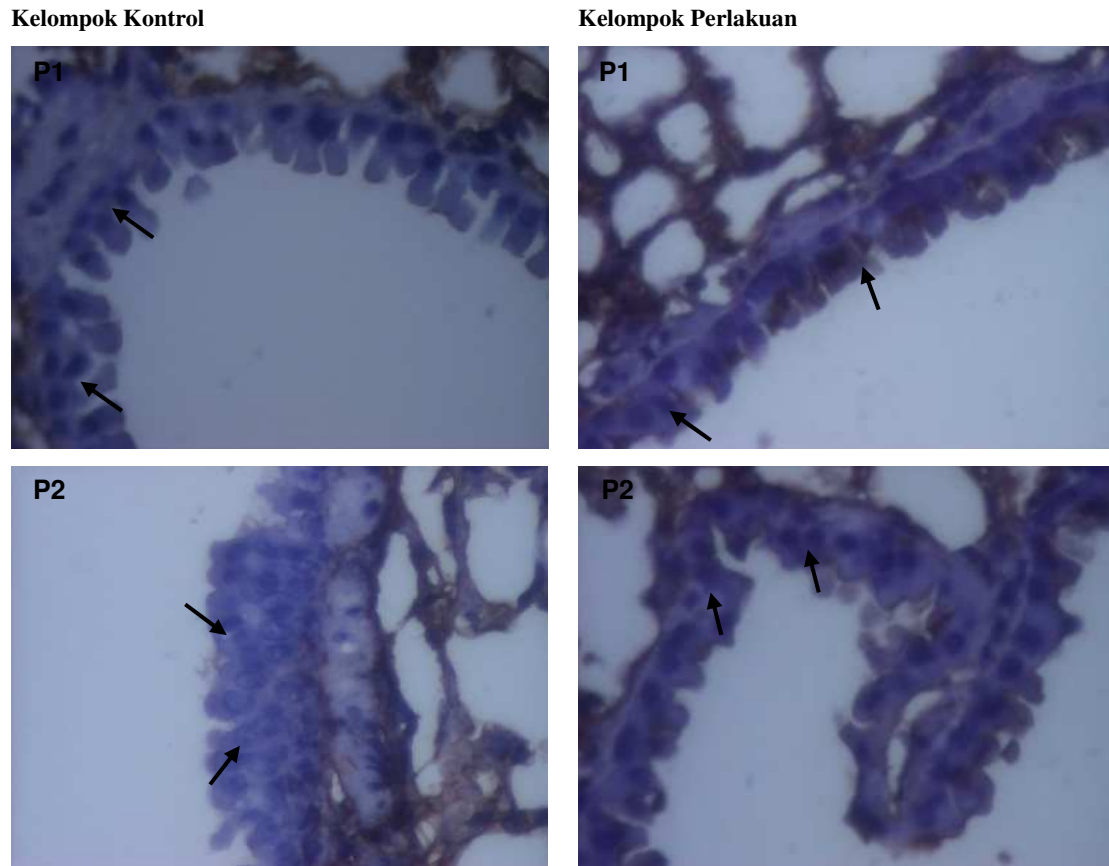
Ekspresi protein Bax

Peran polifenol Mahkota Dewa pada protein Bax dinilai dengan analisis imunohistokimia yang bertujuan untuk evaluasi pengamatan histopatologi. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap ekspresi protein Bax, terdapat peningkatan ekspresi sel protein Bax pada kelompok perlakuan. Pada Gambar 1, terlihat bahwa jumlah sel-sel yang positif pada daerah bronkiolar lebih tinggi pada kelompok yang diberi perlakuan (C dan D) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol karsinogen (A dan B).

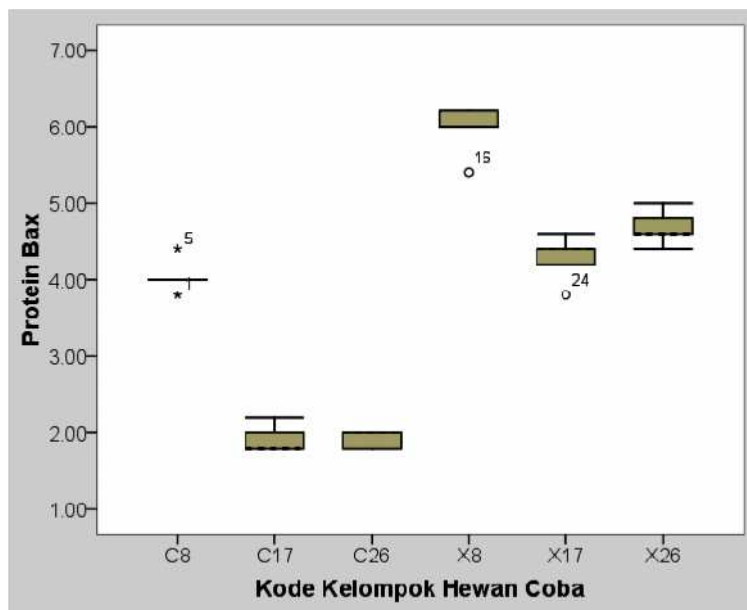
Pada kelompok kontrol karsinogen, ekspresi protein Bax pada minggu ke-8 sebesar $4,04 \pm 0,22$, pada minggu ke-17 sebesar $1,92 \pm 0,18$ dan $1,92 \pm 0,10$ pada minggu ke-26. Pada kelompok kontrol terlihat cenderung mengalami penurunan. Pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan bermakna. Pada kelompok perlakuan pada minggu ke-8 sebesar $5,96 \pm 0,32$ mengalami peningkatan pada minggu ke-17 sebesar $4,28 \pm 0,30$ dan $4,68 \pm 0,22$ pada minggu ke-26 dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil uji statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis memperlihatkan peningkatan secara signifikan ($p=0,000$) dengan cara oral polifenol terhadap ekspresi protein Bax selama karsinogenesis. Selanjutnya perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Uji Mann-Whitney memperlihatkan ekspresi protein Bax terjadi peningkatan pada kelompok perlakuan baik minggu ke-8, 17 dan 26 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data statistik dapat dilihat pada Tabel 1.

Uji statistik tingkat signifikansi pada ekspresi protein Bax menunjukkan kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol minggu ke-8, hasil uji menunjukkan bermakna ($p=0,008$) dengan keseluruhan minggu pengamatan baik pada kelompok kontrol minggu ke-17 dan 26 serta kelompok perlakuan minggu ke-8, 17 dan



Gambar 1. Lokasi imunohistokimia sel jaringan paru yang diinduksi B(a)P yang terekspresi protein Bax pada kelompok kontrol karsinogen (A, B) dan kelompok perlakuan (C, D). Perlakuan dengan polifenol mengakibatkan peningkatan protein Bax pada epitel bronkiolus. Warna coklat pada sitoplasma menunjukkan adanya ekspresi protein Bax. Inti sel tampak bulat-oval terpulas warna coklat (panah warna hitam). Pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. P1 menunjukkan pembedahan pertama minggu ke-8 dan P2 menunjukkan pembedahan ketiga minggu ke-26.



Gambar 2. Grafik *boxplot* efek polifenol Mahkota Dewa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap ekspresi sel protein Bax pada mencit strain Balb/c yang diinduksi *Benzo(a)pyrene* (BaP).

Tabel 1. Hasil uji tingkat signifikansi ekspresi protein Bax pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

No.	Kelompok	Minggu	Kelompok/minggu					
			Kontrol			Perlakuan		
			8	17	26	8	17	26
1.	Kontrol	8	-	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
		17		-	0,008	0,008	0,008	0,008
		26			-	0,008	0,008	0,008
2.	Perlakuan	8				-	0,008	0,008
		17					-	0,008
		26						-

Keterangan: bermakna nilai (p<0,05)

Sumber: Data Penelitian Primer, 2011

26. Pada kelompok kontrol minggu ke-17, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,008) dengan minggu ke-26 dan kelompok perlakuan minggu ke-8, 17 dan 26. Sedangkan pada minggu ke-26, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,008) dengan keseluruhan minggu ke-8, 17 dan 26 kelompok perlakuan.

Pada kelompok perlakuan minggu ke-8, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,008) dengan minggu ke-26 kelompok perlakuan dan kelompok perlakuan minggu ke-17 menunjukkan bermakna (p=0,008) dengan minggu ke-26 kelompok perlakuan.

Ekspresi protein Bcl-2

Efek polifenol Mahkota Dewa pada protein Bcl-2 dinilai dengan analisis imunohistokimia yang bertujuan untuk evaluasi pengamatan histopatologi. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap ekspresi protein Bcl-2, terdapat penurunan ekspresi sel protein Bcl-2 pada kelompok perlakuan. Pada Gambar 3 terlihat bahwa jumlah sel-sel yang positif pada daerah bronkiolar berkurang pada kelompok yang diberi perlakuan (C dan D) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol karsinogen (A dan B).

Pada kelompok kontrol karsinogen, ekspresi protein Bcl-2 pada minggu ke-8 sebesar 5,80±0,32, meningkat pada minggu ke-17 sebesar 7,68±0,43 dan 9,64±0,26 pada minggu ke-26. Pada kelompok kontrol terlihat mengalami peningkatan. Pada kelompok perlakuan mengalami penurunan secara bermakna. Pada kelompok perlakuan polifenol pada minggu ke-8 sebesar 5,12±0,22 mengalami penurunan pada minggu ke-17 sebesar 4,84±0,08 dan 7,38±0,21 pada minggu ke-26 dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil uji statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis memperlihatkan peningkatan secara signifikan (p=0,000) dengan cara oral polifenol terhadap ekspresi protein Bcl-2 selama karsinogenesis. Selanjutnya perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Uji Mann-Whitney memperlihatkan ekspresi protein Bcl-2 terjadi penurunan pada kelompok perlakuan baik minggu ke-8, 17 dan 26 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data statistik dapat dilihat pada Tabel 2.

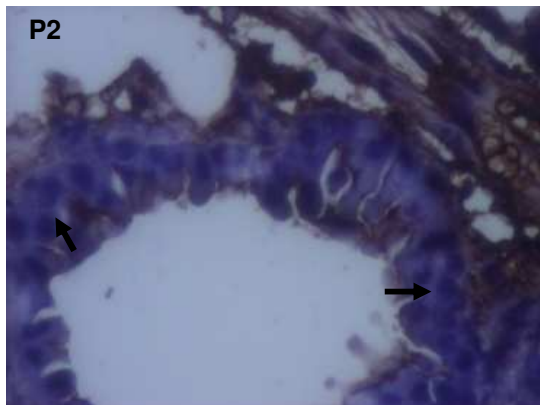
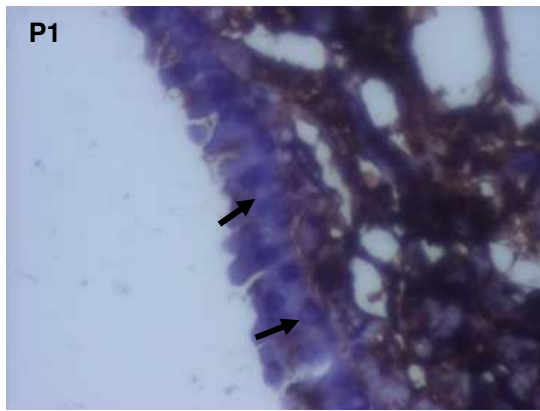
Uji statistik tingkat signifikansi pada ekspresi protein Bcl-2 menunjukkan kelompok perlakuan lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol minggu ke-8, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,032) pada kelompok kontrol minggu ke-17 sedangkan menunjukkan bermakna (p=0,008) pada seluruh minggu pada kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol minggu ke-17, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,008) pada keseluruhan minggu pengamatan baik kelompok kontrol minggu ke-26 dan minggu ke-8, 17, dan 26 pada kelompok perlakuan. Sedangkan kelompok kontrol minggu ke-26, hasil uji menunjukkan bermakna (p=0,032) dengan kelompok perlakuan minggu ke-8 dan bermakna (p=0,008) dengan minggu ke-17 dan 26.

Hasil uji kelompok perlakuan pada minggu ke-8 menunjukkan bermakna (p=0,008) pada minggu ke-17 dan minggu ke-26 dan pada kelompok perlakuan minggu ke-17 menunjukkan bermakna (p=0,008) dengan kelompok perlakuan minggu ke-26.

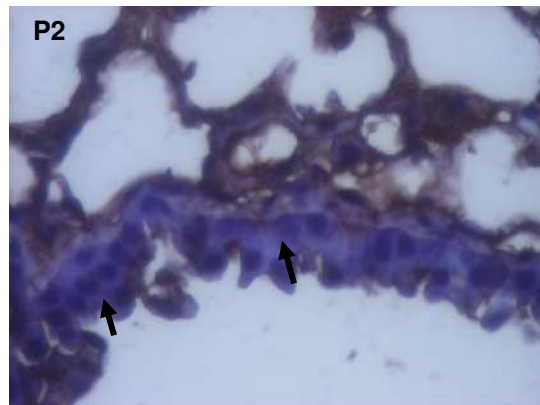
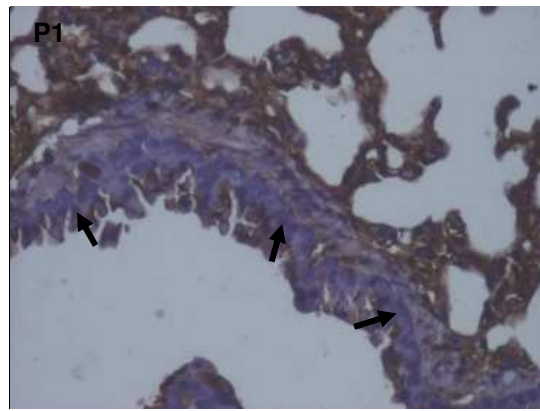
Peningkatan dan penurunan berbagai variabel penelitian pada beberapa variabel terikat yang diuji, menunjukkan peran polifenol made mampu menghambat perkembangan kanker paru pada hewan percobaan. Penghambatan ini dapat disebabkan karena keterikatan berbagai variabel yang diuji baik pada proliferasi sel maupun apoptosis. Untuk itu, hasil ini dilanjutkan dengan pengujian terhadap seluruh variabel terikat yang diamati, dengan menggunakan uji korelasi Spearman.

Berdasarkan uji normalitas, data terdistribusi tidak normal sehingga dilanjutkan dengan melakukan transformasi data (log₁₀) dimana hasilnya menunjukkan tidak normal. Untuk itu, pengujian dilanjutkan dengan menggunakan uji korelasi Spearman. Interpretasi hasil uji korelasi didasarkan pada nilai p,

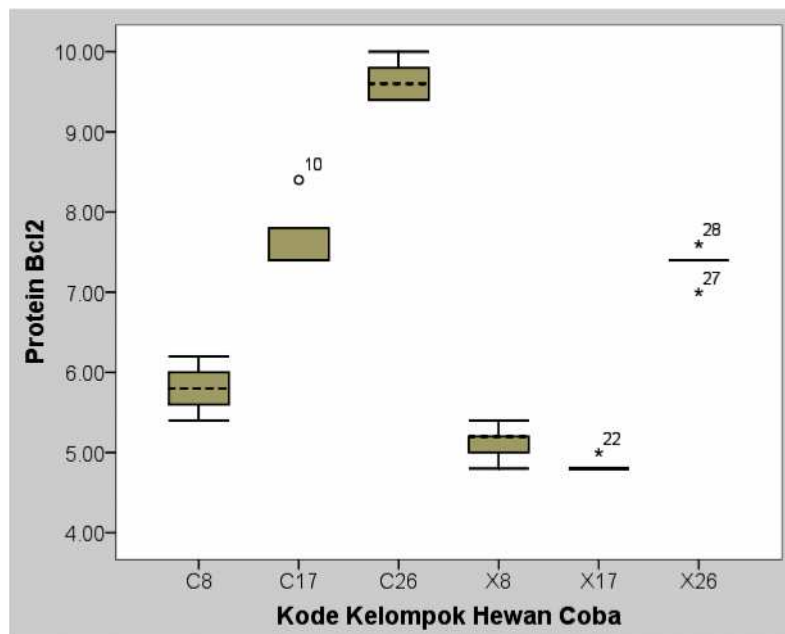
Kelompok Kontrol



Kelompok Perlakuan



Gambar 3. Lokasi imunohistokimia sel jaringan paru yang diinduksi B(a)P yang terekspresi protein Bcl-2 pada kelompok kontrol karsinogen (A, B) dan kelompok perlakuan (C, D). Perlakuan dengan polifenol made mengakibatkan penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada epitel bronkiolar. Warna coklat pada sitoplasma menunjukkan adanya ekspresi protein Bcl-2. Inti sel tampak bulat-oval terpusas warna biru-ungu. Pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. P1 menunjukkan pembedahan pertama minggu ke-8 dan P2 menunjukkan pembedahan ketiga minggu ke-26.



Gambar 4. Grafik *boxplot* efek polifenol Mahkota Dewa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap ekspresi sel protein Bcl-2 pada mencit strain Balb/c yang diinduksi *Benzo(a)pyrene* (BaP).

Tabel 2. Hasil uji tingkat signifikansi ekspresi protein Bcl-2 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

No.	Kelompok	Minggu	Kelompok/minggu					
			Kontrol			Perlakuan		
			8	17	26	8	17	26
1.	Kontrol	8	-	0,032	0,008	0,008	0,008	0,008
		17		-	0,008	0,008	0,008	0,008
		26			-	0,032	0,008	0,008
2.	Perlakuan	8				-	0,008	0,008
		17					-	0,008
		26						-

Keterangan: bermakna (p<0,05)
 Sumber: Data Penelitian Primer, 2011

Tabel 3. Nilai uji korelasi Spearman antara ekspresi protein Bax dan protein Bcl-2

correlations		
Variabel	Bax	Bcl-2
Bax	1	-.621**
		.000
Bcl-2		1

kekuatan korelasi, serta arah korelasi. Parameter kekuatan korelasi (r) dengan nilai 0,00-0,199 (sangat lemah); nilai 0,20-0,399 (lemah); nilai 0,40-0,599 (sedang); 0,60-0,799 (kuat) dan nilai 0,80-1,000 (sangat kuat). Di samping itu, arah korelasi positif (+) menunjukkan searah, dimana semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lainnya, sedangkan arah korelasi negatif (-) menunjukkan berlawanan arah, dimana semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa hasil korelasi antara hasil korelasi protein Bax dengan protein Bcl-2, dari hasil di atas diperoleh nilai kemaknaan 0,000 yang menunjukkan bahwa korelasi antara Bax dengan skor Bcl-2 adalah bermakna. Nilai korelasi Spearman sebesar -0,621 menunjukkan korelasi negatif dengan kekuatan korelasi kuat.

PEMBAHASAN

Rasio Bcl-2/Bax tampak menjadi penting dalam menentukan kecenderungan keseluruhan sel untuk menjalani apoptosis. Suatu peningkatan rasio dapat memblokir apoptosis yang diperantarai mitokondria dengan mencegah pelepasan sitokrom c dari mitokondria sehingga menghambat caspase 9 dan akhirnya mengaktifasi caspase 3. Selain jalur mitokondria, apoptosis juga ditransduksi oleh death receptor yang berinteraksi dengan ligan kognitif mereka sehingga mencetuskan kaskade peristiwa yang pada akhirnya mengakibatkan aktivasi caspase.^{24,26} Caspase 8, pada jalur death receptor yang merupakan satu jalur mayor yang melibatkan respon terhadap kematian yang menginduksi ligan seperti TNF, FasL atau TRAIL.²⁷⁻²⁹

Anggota famili protein Bcl-2 adalah regulator penting dari jalur apoptotik. Bcl-2 adalah molekul efektor upstream (ke atas) pada jalur apoptotik dan diidentifikasi sebagai supresor apoptosis yang poten. Bcl-2 banyak ditemukan terutama pada membran mitokondria bagian luar, retikulum endoplasma dan membran inti. Beberapa anggota famili Bcl-2 pro-apoptosis ditemukan dalam sel dengan konsentrasi yang cukup untuk menyebabkan apoptosis.³⁰ Meskipun demikian anggota famili Bcl-2 tersebut tidak langsung menyebabkan apoptosis. Bcl-2 ditunjukkan membentuk kompleks heterodimer dengan anggota proapoptotik Bax, dengan demikian menetralkan efek proapoptotiknya. Oleh karena itu, rasio Bax : Bcl-2 adalah faktor yang menentukan dan berperan penting dalam menentukan sel-sel akan mengalami kematian atau bertahan hidup. Bax merupakan suatu anggota famili protein Bcl-2 yang meningkatkan apoptosis.³¹ Protein Bcl-2 dikenal membentuk heterodimers dengan protein Bax in vivo dan rasio molar Bcl-2 terhadap Bax menentukan apoptosis diinduksi atau dihambat dalam beberapa jaringan.³² Protein Bax mengendalikan kematian sel melalui keterlibatan Bax dalam gangguan mitokondria dan selanjutnya pelepasan sitokrom C dan juga dianggap sebagai salah satu target p53 primer.³³ Dalam beberapa hal mitochondrial outer membrane permeability (MOMP) dikendalikan oleh protein famili Bcl-2, dan anggota anti-apoptosis Bcl-xL dan Bcl-2 yang keduanya menghambat MOMP. Dengan demikian, anggota pro-apoptosis seperti Bak atau Bax, baik yang diaktifkan oleh beberapa protein BH3-only (Bid, Bim, Bad, PUMA, dan NOXA), dapat meningkatkan MOMP.³⁴

Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa pemberian secara oral polifenol Mahkota Dewa dapat meningkatkan ekspresi protein Bax pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (tidak diberi perlakuan) pada mencit. Hasil ini ditunjukkan melalui uji statistik dengan ($p=0,000$). Oleh karena nilai $p<0,05$ ($0,000$), maka polifenol Mahkota Dewa dapat menghambat apoptosis sel melalui peningkatan ekspresi protein Bax pada mencit strain Balb/c.

Selain ekspresi protein Bax, pemberian polifenol Mahkota Dewa pada kelompok perlakuan dapat menurunkan jumlah ekspresi Bcl-2 pada mencit strain Balb/c. Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa pemberian secara oral polifenol Mahkota Dewa dapat menurunkan ekspresi protein Bcl-2 pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (tidak diberi perlakuan) pada mencit. Hasil ini ditunjukkan melalui uji statistik dengan ($p=0,000$). Oleh karena nilai $p<0,05$ ($0,000$), maka polifenol Mahkota Dewa dapat menghambat apoptosis sel melalui *down-regulation* ekspresi protein Bcl-2 pada mencit strain Balb/c. Perlakuan dengan polifenol made memperlihatkan perbandingan Bcl-2 : Bax pada peningkatan apoptosis.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Letchoumy PV *et al*, bahwa pemberian dua polifenol teh hitam yaitu *polyphenon-B* (PB) dan BTF-35 pada karsinogenesis kantong buccal hamster yang ditimbulkan oleh DMBA pada kelompok perlakuan secara signifikan dapat menurunkan ekspresi Bcl-2 dan meningkatkan ekspresi Bax.²⁵ Hal yang sama ditemukan pada penelitian lain. Diallyl disulfida, suatu komponen dari bawang, menginduksi apoptosis pada sel-sel kanker payudara manusia positif- dan negatif-reseptor estrogen yang berkorelasi dengan regulasi-naik dari Bax dan regulasi-turun Bcl-2. Perubahan rasio Bax: Bcl-2 diamati pada sel-sel kanker paru sel kecil (*non-small cell lung cancer*) yang diberi perlakuan dengan diallyl sulfida, diallyl disulfida dan ekstrak bawang.³⁵

Penekanan terhadap anggota anti-apoptosis atau aktivasi anggota proapoptosis famili Bcl-2 mengakibatkan perubahan permeabilitas membran mitokondria sehingga terlepasnya sitokrom c dalam mitokondria.^{36,37} Bcl-2 merupakan target yang banyak digunakan dalam penemuan obat-obat baru. Bcl-2 menunjukkan *over*-ekspresi pada berbagai keganasan dan sering dihubungkan dengan kegagalan terapi klinis.

Protein Bcl-2 dan Bax merupakan anggota dari keluarga Bcl-2 yang berperan penting dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsik. Protein Bcl-2 bertindak sebagai antiapoptosis sedangkan Bax merupakan protein proapoptosis. Bcl-2 dan Bax dapat membentuk heterodimer

yang merupakan bentuk tidak aktif dari keduanya, sedangkan bentuk aktifnya terbentuk homodimer. Rasio antara proapoptosis Bax dan *prosurvival* Bcl-2 lebih penting dibanding dengan tingkat masing-masing dalam sel. Pemberian suatu senyawa terhadap kanker paru dapat memperlihatkan efek terhadap tingkat ekspresi protein Bcl-2 dan Bax. Penurunan ekspresi Bcl-2 sebagai antiapoptosis dan peningkatan ekspresi Bax sebagai proapoptosis menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke sitosol dan berikatan dengan apaf-1 membentuk apoptosom. Pada apoptosom ini terjadi aktivasi *caspase* dan memacu apoptosis.³⁸ Pemacuan apoptosis tidak hanya ditentukan dari tingkat ekspresi Bcl-2 dan Bax saja tetapi lebih ditentukan oleh rasio keduanya.³⁹

Apoptosis dikontrol oleh sejumlah *gen regulator* seperti famili Bcl-2. Keluarga Bcl-2 berperan dalam mengatur apoptosis. Bcl-2 diketahui mencegah sel dari apoptosis dengan aktivitas melalui interaksi dengan Bax. Pengontrolan apoptosis melalui keseimbangan perbandingan antara protein proapoptosis dan anti-apoptosis. Dalam kondisi kadar proapoptosis Bax meningkat, maka apoptosis akan dipercepat. Sebaliknya, jika kadar antiapoptosis Bcl-2 meningkat, maka sel akan tetap *survival*.⁴⁰ Aktivitas antiapoptosis Bcl-2 adalah mengikat Bax sehingga protein Bax tidak dapat membuat ikatan dengan protein proapoptosis lain seperti Bad. Dengan peningkatan ekspresi protein Bax dan penurunan protein Bcl-2, maka ikatan ini tidak terbentuk sehingga akan mengaktifkan sitokrom c yang kemudian lepas dari mitokondria untuk selanjutnya terjadi aktivasi *caspase-9*, *caspase-3* secara berantai hingga terjadi apoptosis.³⁸

Bcl-2 merupakan salah satu *regulator* penting yang menentukan lepasnya sitokrom c beserta sejumlah faktor lain dari mitokondria yang menyebabkan apoptosis. Apoptosis akan terhambat pada sel yang menghasilkan *over*-ekspresi Bcl-2. Melalui interaksi dengan Bax terbentuk heterodimer yang menginaktivasi Bax sehingga mencegah permeabilitas membran mitokondria dan pelepasan sitokrom c. Terjadinya apoptosis secara lebih tepat dengan melihat rasio Bax dan Bcl-2. Paparan polifenol Mahkota Dewa terbukti menyebabkan apoptosis melalui jalur mitokondria. Adanya penurunan ekspresi Bcl-2 dan peningkatan ekspresi Bax, maka akan terbentuk heterodimer yang memicu pelepasan sitokrom c yang akan berikatan dengan apaf-1 untuk mengaktifkan *caspase-9* yang selanjutnya mengaktifkan kaskade *caspase* sehingga terjadi apoptosis.⁴¹

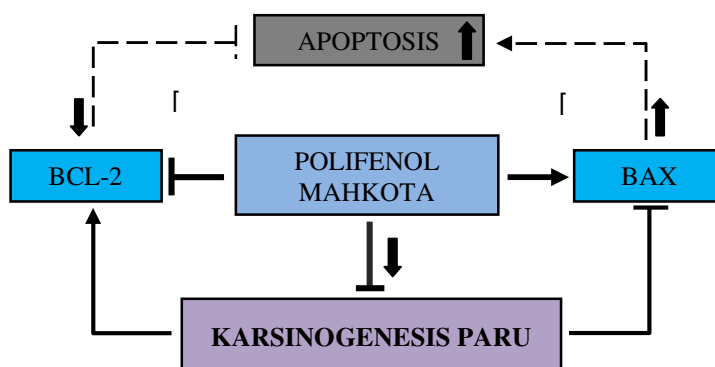
Penelitian-penelitian mengenai ekspresi Bcl-2 sebagai petanda kanker paru memberikan hasil yang saling bertentangan. Meskipun satu penelitian menunjukkan

bahwa ekspresi Bcl-2 yang tinggi memberikan prognosis yang buruk, namun beberapa penelitian lainnya menunjukkan bahwa Bcl-2 adalah suatu petanda prognostik independen pada kelangsungan hidup yang baik,⁴² suatu temuan yang tampaknya berlawanan. Ekspresi berlebihan Bcl-2 dan Bcl-xL diketahui menghambat aktivitas pro-apoptosis dari Bax. Dalam sel-sel atau jaringan normal, Bax sebagian besar terletak dalam sitosol. Setelah stimulasi apoptosis, Bax mengalami translokasi ke mitokondria dan membentuk saluran pada membran mitokondria. Sel yang memutasikan Bax relatif resisten terhadap beberapa jenis kemoterapi. Dampak ekspresi Bax pada hasil kanker paru di stadium awal penyakit masih belum diteliti. Dalam suatu penelitian, mengenai penyakit stadium lanjut, ekspresi Bax dikaitkan dengan peningkatan kelangsungan hidup rata-rata pada stadium IV NSCLC.⁴³

Protein Bax dan Bcl-2, berdasarkan hasil korelasi menunjukkan nilai signifikansi ($p=0,000$) bermakna, dengan nilai korelasi yang sangat kuat ($r=0,000$). Hasil ini membuktikan bahwa penurunan ekspresi Bcl-2 sebagai antiapoptosis dan peningkatan ekspresi Bax sebagai proapoptosis menyebabkan pelepasan sitokrom c. Pelepasan sitokrom c mencetuskan pertemuan Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor*) dan *pro-caspase 9* untuk membentuk suatu apoptosome. ATP dibutuhkan untuk rekrutmen *pro-caspase 9* oleh Apaf-1 melalui apa yang disebut CARD (*caspase recruiting domain*). Kemudian *pro-caspase 9* secara autolitik dipecah menjadi *caspase 9* aktif, yang kemudian mengaktifkan *pro-caspase 3* menjadi *caspase* aktif yang menghasilkan pemecahan substrat dan apoptosis. Dengan hasil ini terbukti bahwa induksi apoptosis oleh polifenol Mahkota Dewa tidak hanya ditentukan dari tingkat ekspresi Bcl-2 dan Bax saja tetapi lebih ditentukan oleh rasio keduanya.³⁹ Secara umum, hasil penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5 hasil skema mekanisme peran protein Bax dan Bcl-2 di bawah ini.

Polifenol Mahkota Dewa dapat menghambat reseptor kematian dan juga mentarget *caspase* yang menghambat terjadinya apoptosis. Jalur intrinsik membutuhkan kerusakan membran mitokondria dan pelepasan protein-protein mitokondria ke dalam sitoplasma. Sinyal stres yang dikeluarkan oleh senyawa kemopreventif polifenol mengaktifasi protein 53 sehingga mampu meregulasi protein-protein pro-apoptosis dan protein-protein anti-apoptosis, mengakibatkan pada pelepasan sitokrom c dari membran internal mitokondria. Sitokrom c membentuk suatu apoptosome dengan Apaf-1 dan *caspase-9*, dengan demikian menginisiasi kaskade *caspase* apoptotik. *Caspase* yang teraktivasi mengkatalisasi meleburnya struktur intraseluler yang mengakibatkan pada kematian sel apoptotik. Protein-protein famili Bcl-2 meregulasi apoptosis saat protein-protein tersebut membentuk kompleks yang memasuki membran mitokondria, meregulasi pelepasan sitokrom c dan protein-protein lain. Bax yang merupakan anggota pro-apoptosis famili Bcl-2 juga tampak menjadi target p53 dan mengalami *up-regulation* pada sejumlah sistem selama apoptosis yang diperantarai p53. Sisi lain, peningkatan ekspresi Bax dan penurunan Bcl-2 ditunjukkan selama apoptosis. Hasil penelitian ini, menunjukkan tidak hanya melibatkan jalur *signaling* p53 pada aktivasi Bax dalam apoptosis, tetapi terlihat pada ekspresi Bcl-2, sehingga menunjukkan bahwa hubungan silang antara protein pro- dan anti-apoptosis merupakan faktor penting dalam mengatur keseimbangan antara faktor pro dan anti-apoptosis yang dapat menentukan terjadinya kematian sel secara terprogram.

Selama beberapa tahun terakhir, terapi kanker telah dengan menggunakan fitofarmaka telah memperlihatkan banyak perkembangan yang menarik, namun penyembuhan karena kanker masih tetap kompleks seperti jenis penyakit ini sendiri, karena mekanisme pembunuhan tumor masih belum diketahui secara keseluruhan. Identifikasi berbagai peran protein dari



Gambar 5. Hasil skema mekanisme polifenol Mahkota Dewa dalam menginduksi apoptosis sel pada proses karsinogenesis paru. Keterangan: (a) Menghambat ekspresi Bcl-2 dan (b) Menstimulasi ekspresi Bax.

jalur *signaling* yang menyebabkan kematian sel kanker serta perubahan yang ditarget pada molekul-molekul tersebut membantu secara selektif menginduksi apoptosis pada sel kanker.

SIMPULAN

Polifenol Mahkota Dewa mampu melakukan *up-regulation* protein Bax dan *down-regulation* protein Bcl-2 pada apoptosis selama karsinogenesis paru pada mencit Balb/c hasil induksi *benzo(a)pyrene* (BaP).

DAFTAR PUSTAKA

1. Vansteenkiste JF. Imaging in lung cancer: positron emission tomography scan. *Eur. Respir J.* 2002;19(35): 49s-60s.
2. Stepanov I, Carmella SG, Hecht SS, Duca G. Analysis of tobacco-specific nitrosamines in moldovan cigarette tobacco. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(10):2793-97.
3. Brock CS, Lee SM. Anti-angiogenic strategies and vascular targeting in the treatment of lung cancer. *Eur. Respir J.* 2002;19:557-70.
4. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Lung cancer statistics 2004. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2004;54:8-29.
5. Breuer RHJ, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2005;72:313-30.
6. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Molecular origins of cancer: lung cancer. *N. Engl. J. Med* 2008; 359(13):1367-80.
7. Yu D, Zhang X, Liu J, Yuan P, Tan W, Guo Y, et al. Characterization of functional excision repair cross-complementation group I variants and their association with lung cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2878-86.
8. Grossi F, Loprevite M, Chiamomondia M, Ceppia P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognosis significance of K-ras, p53, Bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* 2003;39(9):1242-50.
9. Li D, Firozi PF, Wang LE, Bosken CH, Spitz MR, Hong WK, et al. Sensitivity to DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2001;107:84-8.
10. Caputi M, Russo G, Esposito V, Mancini A, Giordano A. Role of cell-cycle regulators in lung cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2005;205:319-27.
11. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl. J Med.* 2002;346:92-8.
12. Syahrudin E. Mekanisme non-P-glycoprotein multi-drug resistance (non P-gP MDR) dan faktor yang terlibat pada resisten sel kanker paru. *J Respir. Indo.* 2005;23(2):93-8.
13. Masuda N, Fukuoka M, Fujita A, Kurita T, Tsuchiya S, Nagao KA. Fase II trial of combination of CPT-11 and cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer. *Br J. Cancer* 2000;78:251-6.
14. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanungsong R, et al. Flavonoids I food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2004;59:113-22.
15. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J. Nutr.* 2005;93:93-9.
16. Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci* 2003;10:219-27.
17. Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:124-31.
18. Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cell through p53-dependent Bax induction. *FEBS Letters* 2002;512:334-40.
19. Tock B, Zwiebel JA, Schoenfeldt M: Clinical trials referral resource. *Current clinical trials of G3139.* *Oncology* 2003;17:1244-58.
20. Duarte RL de M, Paschoal MEM. Molecular markers in lung cancer: prognosis role and relationship to smoking. *J. Bras. Pneumol.* 2005;32(1):56-65.
21. Taik-Koo Y, Sung-Ho K, Yun-Sil L. Trial of a new medium-term model using benzo(a)pyrene induced lung tumor in newborn mice. *Anticancer Res.* 1995;15:839-46.
22. Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, Pal Debalina, Panda CKr, Das S. Black tea polyphenols restrict benzo(a)pyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2006;7:661-6.
23. Banerjee S, Panda CKr, Das S. Clove, a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27(8):1654.
24. Mohan KPVC, Devaraj H, Prathiba D, Hara Y, Nagini S. Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Bioch. et Biophys. Acta* 2006;1760(10):1536-44.
25. Letchoumy PV, Mohan KVPC, Prathiba D, Hara Y, Siddavaram N. Comparative evaluation of antiproliferative, antiangiogenic and apoptosis inducing potential of black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Journal of Carcinogenesis* 2007;6(19):1-13.
26. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondria pathway of apoptosis (review). *Int. J. Oncol* 2003;22:15-20.
27. Shivapurkar N, Reddy I, Chaudhary PM, GazdarAF. Apoptosis and lung cancer: a review. *J. of Cell. Biochem.* 2003;88:885-98.

28. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:241-3.
29. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1998;11:255-60.
30. Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J and Warger G. Solution structure of bid, an intracellular amplifier of apoptosis signaling. *Cell* 1999;96:615-24.
31. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 2007;28(2):233-9.
32. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
33. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998;281:2027-31.
34. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Different* 2002;9:505-12.
35. Miyoshi N, Nakamura Y, Ueda Y, Abe M, Ozawa Y, Uchida K, et al. Dietary ginger constituents, galanals A and B, are potent apoptosis inducers in human T lymphoma Jurkat cells. *Cancer Lett* 2003;199:113-9.
36. Desagher S, Martinou J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biol* 2000;10:369-77.
37. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
38. Waterhouse NJ, Goldstein JC, Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD and Green DR. Cytochrome c maintains mitochondria transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptosis process. *J. Cell Biol.* 2001;153(2):319-28.
39. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annual Rev. Immunol.* 1998;16:395-419.
40. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J and Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl1/A1 is direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:382-7.
41. Zhivotovsky B, Orrenius S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes: review. *Carcinogenesis* 2006; 27(10):1939-45.
42. Cox G, Louise Jones J, Andi A, Abrams KR, O'Byrne KJ. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:417-26.
43. Gessner C, Liebers U, Kuhn H, et al. Bax and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of non-small cell lung cancer. *Eur. Respir. J* 2002;19:134-40.