



Ekstrak Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme*) Fraksi Diklorometanolik dan Ekspresi Caspase-3 dan p21 Cell-Line Kanker Payudara MCF-7

Agung Putra *, Tjahjono **, Winarto ***

ABSTRACT

*The dichloromethanolic fraction of keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) extract and the expression of p21 and caspase-3 of MCF-7 breast cancer cell-line*

Background: Breast cancer has a high degree of heterogeneity and problems in therapy, such as insensitive to antiproliferation signal and able to escape from apoptosis program. *Typhonium flagelliforme* (Lodd), Blume (Araceae) more commonly known as keladi tikus in Indonesia, often used as alternative in treating cancer, including breast cancer. The objective of study is proving the dichloromethanolic fraction of *Typhonium flagelliforme* tuber extracts influence on the expression of caspase-3 and p21 of MCF-7 cell-line that have deletion in CASP-3 gene.

Methods: This study adapts laboratory experimental in-vitro in cells-line MCF-7, with "post test control group only design" and divided into two groups, were incubated in 5h, 10h and 20h. The control group received no other treatment. The treatment group received the dichloromethanolic fraction of *Typhonium flagelliforme* tuber extracts in IC_{50} . Starting with cytotoxicity assay using MTT to determine the IC_{50} , followed by Immunocytochemical analysis to observe the expression of p21 and caspase-3.

Results: Paired sample T test shows a significant differences in treatment groups compared with the controls ($p < 0.05$), namely an increase in the expression of nuclear p21 and caspase-3 on 20h incubation.

Conclusion: There were increased in the expression of caspase-3 and nuclear p21, as well as depleted the cytoplasmic of p21 on MCF-7 cell-line that have deletion in CASP-3 in treatment by tuber extract of *Typhonium flagelliforme* dichloromethanolic fraction.

Keywords: p21, caspase-3, MCF-7 cell-line, *Typhonium flagelliforme*

ABSTRAK

Latar belakang: Kanker payudara mempunyai tingkat heterogenitas tinggi dan problem dalam terapi, diantaranya tidak sensitif terhadap signal antiproliferasi dan mampu menghindari dari program apoptosis. *Typhonium flagelliforme* (Lodd). Blume (Araceae) yang lebih dikenal sebagai keladi tikus di Indonesia, sering digunakan sebagai alternatif dalam mengobati penyakit kanker, termasuk kanker payudara. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh *Typhonium flagelliforme* terhadap ekspresi caspase-3 dan p21 pada cell-line MCF-7 yang mengalami delesi gen CASP-3.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorik secara invitro pada cell-line MCF-7, dengan rancangan penelitian post test control group only design, yang dibagi dalam 2 kelompok dan diinkubasi dalam 5 jam, 10 jam dan 20 jam. Kelompok kontrol tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok perlakuan mendapatkan ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik kadar 62,08 g/mL (IC_{50}). Dimulai dengan uji sitotoksitas menggunakan MTT untuk menentukan IC_{50} , dilanjutkan analisis imunositokimia untuk melihat ekspresi p21 dan caspase-3.

Hasil: Paired sample T test menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol ($p < 0,05$), dimana terjadi peningkatan ekspresi caspase-3 dan p21 nukleus serta depleksi p21 sitoplasmik pada inkubasi 20 jam.

Simpulan: Ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik mampu meningkatkan ekspresi caspase-3 dan p21 nukleus serta depleksi p21 sitoplasmik cell-line MCF-7 yang mengalami delesi gen CASP-3.

* Bagian Patologi Anatomi, FK Unissula, Jl. Raya Kaligawe Km 4, Semarang

** Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr. Sutomo 18 Semarang

*** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr. Sutomo 18 Semarang

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu keganasan tersering pada wanita dan merupakan penyebab kematian terbanyak kelima akibat kanker.¹ Angka kematian dunia diperkirakan mencapai 519.000 dalam setahun, 69% diantaranya terjadi di negara berkembang.² Di Indonesia tahun 1994, kanker payudara wanita menempati urutan terbanyak kedua sebesar 11,77% setelah servik uteri sebesar 17,70%.³

Hingga saat ini upaya penanganan tumor masih banyak terkendala diantaranya adalah tidak sensitifnya terhadap sinyal antiproliferasi, mampu menghindari terhadap program apoptosis sehingga seringkali terjadi kegagalan dan kekambuhan.⁴ Regulasi siklus sel tumor yang berubah akibat instabilitas genetik,⁵ menyebabkan kegagalan dan resistensi sel tumor dalam melakukan fungsi apoptosis.

Sistem *caspase-cascade signaling* berperan sentral dalam terjadinya apoptosis,⁶ baik melalui jalur mitokondria dengan *caspase-9* sebagai inisiator,⁷⁻⁸ maupun jalur reseptor kematian dengan *caspase-8*.⁹⁻¹⁰ Sinyal kematian tersebut akan diteruskan secara bertingkat melalui *caspase-3*, *7* dan *8* sebagai *caspase* efektor, untuk menimbulkan sederet proses apoptosis,¹¹⁻¹² ditandai perubahan morfologi sel yaitu fragmentasi DNA, *membrane blebbing* dan pembentukan *apoptotic bodies*.^{7,8,11}

Aktivitas katalitik *caspase-3* lebih tinggi dibandingkan dengan *caspase* efektor lainnya, menyebabkan *caspase-3* lebih dominan dalam mengeksekusi perubahan morfologis sel yang akan mengalami apoptosis, dengan cara memecah berbagai substrat kematian diantaranya *DFF-45*.¹⁵ Pemecahan *DFF-45* menyebabkan pelepasan *DFF40* endonuklease yang secara bebas memecah DNA menjadi potongan-potongan DNA yang dikenal sebagai *apoptotic bodies*.^{7,8,11} Substrat lain yang ikut dipecah ketika *caspase-3* teraktivasi adalah DNA *repair PARP* dan *PAK2* (*p21-activated kinase 2*),¹⁵ sehingga pemecahan *p21* oleh *caspase-3* yang aktif pada akhir proses apoptosis nampaknya menjadi suatu keharusan.

Peranan utama *p21*^{WAF1/CIP1} adalah mengendalikan aktivitas proliferasi seluler, dengan cara menghambat kelompok protein *cyclin dependent kinase (Cdk)*,¹⁶ sehingga siklus sel tertunda. Hal ini bertujuan memberi kesempatan DNA *repair* bekerja, sehingga kerusakan tingkat DNA dapat segera diperbaiki, tanpa harus melakukan apoptosis,^{16,17} akan tetapi ketika sinyal apoptosis timbul dan menguat, yang berakibat pada aktivasi *caspase-3*, maka pemecahan *p21* harus segera dilakukan, untuk memaksimalkan proses apoptosis dan meningkatkan akselerasi apoptosis.¹⁸ Sisi lain regulasi *p21* dikontrol secara ketat oleh *Wip53* dengan cara

mentransaktivasi gen *p21* pada *area checkpoint* siklus sel.¹⁹

Kemampuan sel kanker mengenal dan melakukan fungsi kontrol proliferasi sel dan apoptosis kembali menjadi sangat penting dalam upaya memaksimalkan pengobatan kanker. Salah satunya adalah mencoba menemukan senyawa yang memiliki karakteristik seperti tersebut di atas pada berbagai tanaman.

Tanaman keladi tikus (*Typhonium flagelliforme*) merupakan salah satu tanaman yang digunakan dalam mengobati berbagai penyakit, termasuk penyakit tumor.²⁰ Kandungan kimia dengan pelarut *dichloromethan* berupa *hexadecanoic acid*, *1-hexadecene*, *phytol*, derivat *phytol*, *linoleic acid*, dan *9-hexadecanoic acid*,²¹⁻²² yang dapat menghambat proliferasi sel tumor,²³ dan mampu menginduksi apoptosis. meskipun demikian mekanisme biomolekuler *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik dalam menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis belum diketahui dengan jelas, terutama pada sel kanker payudara.

Untuk itu dilakukan penelitian pengaruh *Typhonium flagelliforme* fraksi DCM pada *cell-line* kanker payudara MCF-7 yang mengalami delesi gen *CASP-3* (*caspase-3* sedikit/tidak terekspresi),¹⁵ dengan tujuan mengetahui dan menganalisis perbedaan ekspresi *p21* dan *caspase-3* yang timbul setelah diberi perlakuan, sehingga diharapkan dapat dijelaskan mekanisme biomolekuler dalam menghambat proliferasi sel dan meregulasi apoptosis.

METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik invitro pada *cell-line* MCF-7 kanker payudara menggunakan rancangan *post test control group only design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium LPPT Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Bahan tanaman

Tanaman *Typhonium flagelliforme* yang digunakan adalah umbi dan daun segar, diperoleh dari hasil budidaya di Taman Marina Semarang tahun 2011 dan telah dideterminasi di Fakultas Biologi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan UGM.

Ekstraksi *Typhonium flagelliforme*

Umbi dan daun *Typhonium flagelliforme* segar dicuci, dikeringkan suhu 45°C selama 48 jam dan dihaluskan hingga diperoleh serbuk. Berikutnya diekstraksi secara maserasi dengan pelarut semipolar *diklorometan*,²¹⁻²³ diuapkan dengan mesin *rotary vacuum evaporator* suhu

70°C sampai diperoleh ekstrak pekat, kemudian ditimbang.

Pembuatan larutan stok, larutan induk dan larutan uji

Ekstrak umbi 5 mg dan 50 l DMSO dilarutkan hingga diperoleh larutan stok 10⁵ g/mL. Larutan stok 20 uL dan 980 uL RPMI menjadi larutan induk. Larutan induk 500 uL dimasukan dalam *effendrof* ke-1 berisi 500 uL RPMI dan seterusnya secara bertingkat hingga *effendrof* ke-8, diperoleh larutan uji 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 25, 15,62, 7,81 g/mL.

Proses thawing, inisiasi dan panen kultur cell-line MCF-7

Cell-line MC-7 dari tangki nitrogen cair dicairkan suhu 37⁰, pindahkan ke MK (media RPMI dengan FBS 10%, 100 g/ml streptomisin, 100 unit/mL penisilin), sentrifugasi, dan inkubasi suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ selama 24 jam. Panen sel dilakukan setelah membentuk *monolayer* konfluens 80%, dengan cara buang media, cuci sel dengan PBS 3,5 mL, tambahkan *Tripsin-EDTA* 1 ml, media RPMI 14 mL dan sentrifugasi 10 menit.

Uji sitotoksisitas dengan MTT

Sebanyak 100 l suspensi sel (berisi 2x10⁴ *cell-line MCF-7*) didistribusikan ke dalam 96 *well plate*, masukan 100 µl MK berisi larutan uji secara (triplo), kontrol dengan DMSO 0,1%. Inkubasi 48 jam, tambahkan MTT 100 l dan inkubasi 4 jam, tambahkan *stopper* 100 l

SDS 10%, inkubasi 12 jam, dan dibaca dengan *ELISA reader* pada λ=595 nm.

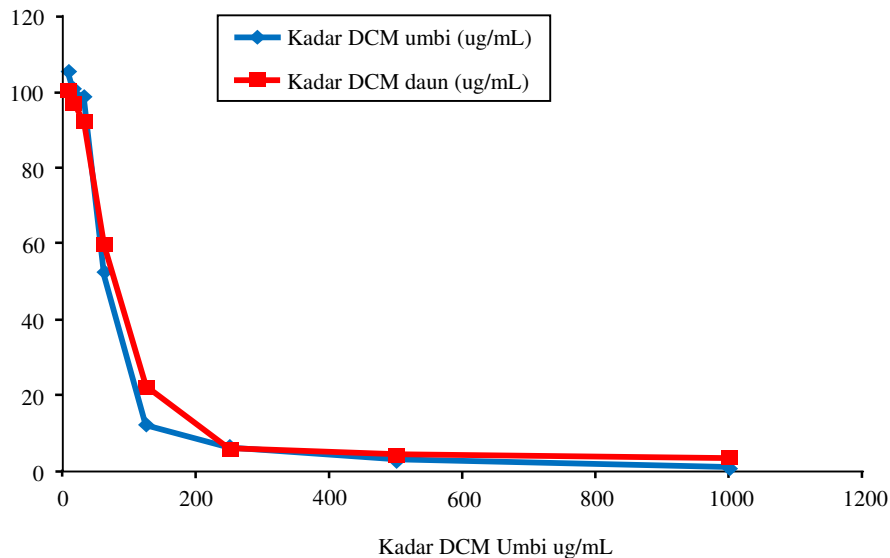
Pemeriksaan ekspresi p21 dan caspase-3 dengan metode imunositokimia

Sebanyak 1000 l suspensi sel (berisi 5x10⁴ sel/1000 l MK) distribusikan di atas *cover slip*, inkubasi 12 jam, cuci sel dengan PBS 500 l, masukan 1000 l MK berisi 62,08 g/ml ekstrak umbi (IC₅₀), sisakan satu kontrol positif dan satu kontrol negatif, setelah itu inkubasi 5 jam, 10 jam dan 20 jam, *cover slip* diangkat dan fiksasi dengan metanol dingin, cuci dengan PBS, teteskan *blocking solution*, *prediluted blocking serum*. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan *monoclonal anti-human p21* antigen dan *caspase-3* antigen.

Ekspresi *p21* dan *caspase-3* yang timbul, dinilai dengan *skoring*, meliputi intensitas pewarnaan inti dan atau sitoplasma, dengan kriteria sebagai berikut: tidak terwarna=0, lemah (L)=1, sedang (S)=2, kuat (K)=3, kemudian dihitung menggunakan rumus skor *IDS* sebagai berikut: (3x% K) + (2x% S) + (1x% L),²⁴ dan nilai maksimal skor 300.

Analisis data

Data disajikan dalam statistik diskriptif dan dilakukan normalitas data dengan uji *Shapiro wilks* kemudian uji beda *Paired sample T test*. Sebelum penelitian, telah dimintakan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.



Tampak potensi ekstrak umbi lebih baik dibandingkan ekstrak daun

Grafik 1. Perbandingan potensi daya hambat ekstrak umbi dan daun *Typhonium flagelliforme*

HASIL

Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak umbi=0,060 g dan daun=0,390 g. Uji sitotoksitas untuk menentukan potensi ekstrak umbi dan daun dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7 dan nilai IC_{50} , dengan *log probit*, nilai IC_{50} ekstrak umbi=63,08 g/mL dan daun=68,65 g/mL.

Viabilitas *cell-line* MCF-7

Hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT menghasilkan data absorbansi (yang terbaca *ELISA reader*) dan dihitung persentase viabilitas sel dan persentase hambatan proliferasi menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan proliferasi} = \frac{\text{OD kontrol sel} - \text{OD perlakuan}}{\text{OD kontrol sel}} \times 100$$

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Tabel 1. Persentase viabilitas *cell-line* MCF-7 dan hambatan proliferasi sel

Kadar (g/mL)	% Sel hidup	% Daya hambat proliferasi sel
1000.00	0,988	98,42
500.00	3,039	96,46
250.00	6,535	93,13
125.00	12,462	86,54
62.50	52,735	47,17
31.25	99,088	0,86
15.62	100,988	-0,94
7.81	105,623	-5,36

Tampak persentase viabilitas *cell-line* MCF-7 sangat rendah pada kadar ekstrak tinggi, viabilitas *cell-line* MCF-7 meningkat dengan berkurangnya kadar ekstrak.

Gambaran *Apoptotic bodies*

Apoptosis ditandai dengan morfologi spesifik, berupa fragmentasi *DNA*, dilapisi oleh membran *blebbing*, membentuk *Apoptotic bodies*,^{17,18,21} seperti pada Gambar 1.

Analisis ekspresi *p21* dengan metode imunositokimia

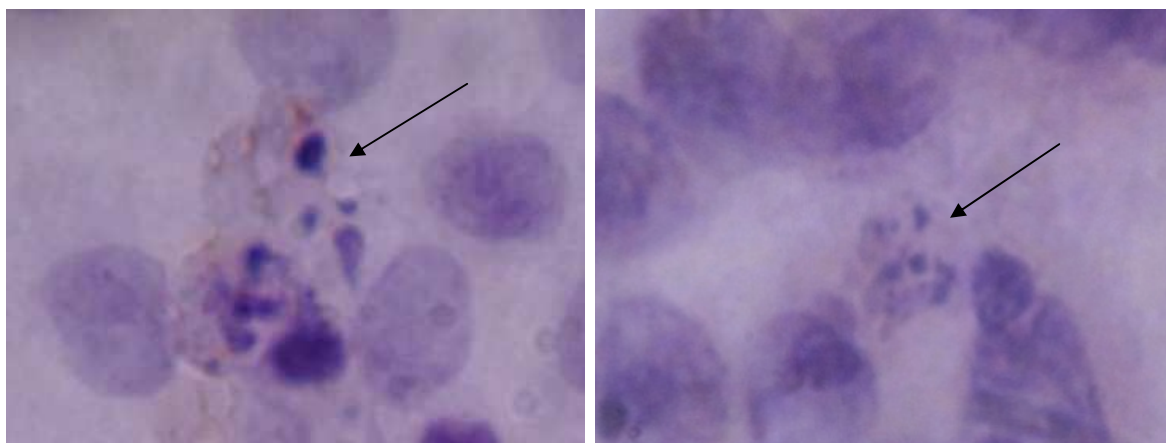
Ekspresi *p21* setelah diberi perlakuan ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik kadar 63,08 g/mL dinilai dengan menggunakan imunositokimia. Bernilai positif bila *p21* terekspresi pada nukleus (warna coklat pada nukleus), sedangkan warna negatif bila *p21* tidak terekspresikan dan atau terekspresi pada sitoplasma (berwarna biru pada nukleus dan atau warna coklat pada sitoplasma) (Gambar 2).

Total skor *IDS p21* sebagai berikut: inkubasi 5 jam=3,741 (1,247%), dimana intensitas warna K=(-), S=(-) dan L=3,741, inkubasi 10 jam=5,19 (1,73%), dimana intensitas warna K=(-), S=(-) dan L=5,19 (1,73%) dan inkubasi 20 jam=26,16 (8,72%), dimana intensitas warna K=(-), S=7,55 (3,77%) dan L=18,61 (4,95%).

Berdasarkan data di atas disimpulkan, terjadi perbedaan ekspresi *p21* antara kelompok perlakuan dan kontrol. dengan perbedaan jelas pada inkubasi 20 jam.

Analisis ekspresi *caspase-3* dengan metode imunositokimia

Ekspresi *caspase-3* setelah diberi perlakuan ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik kadar 63,08 g/mL dinilai dengan menggunakan imunositokimia. Bernilai positif bila *caspase-3* terekspresi pada



Gambar 1. Tampak *Apoptotic bodies* (arah panah) pada kelompok perlakuan dengan inkubasi 20 jam

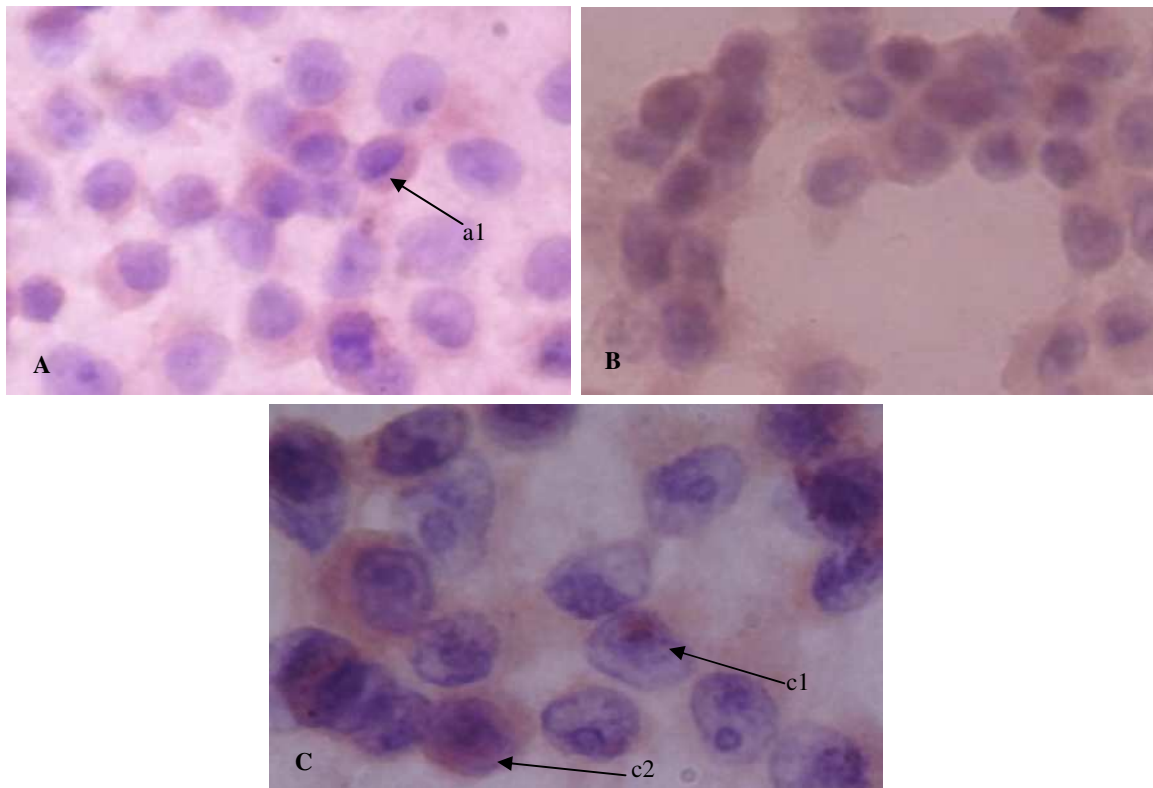
sitoplasma (warna coklat pada sitoplasma), dan bernilai negatif bila *caspase-3* tidak terekspresi (warna ungu/ biru pada sitoplasma) (Gambar 3).

Total skor *IDS caspase-3* sebagai berikut; inkubasi 5 jam=18,44 (6,15%), dengan intensitas warna K(-), S(-) dan L=18,44, inkubasi 10 jam=47,64 (15,88%), dimana K=9,3 (3,1%), S=20,62 (10,31%) dan L=17,72 (2,47%), dan inkubasi 20 jam=146,68 (48,892%), K=42,3 (14,1%) S=54,24 (27,12%) dan L=50,14 (7,67%).

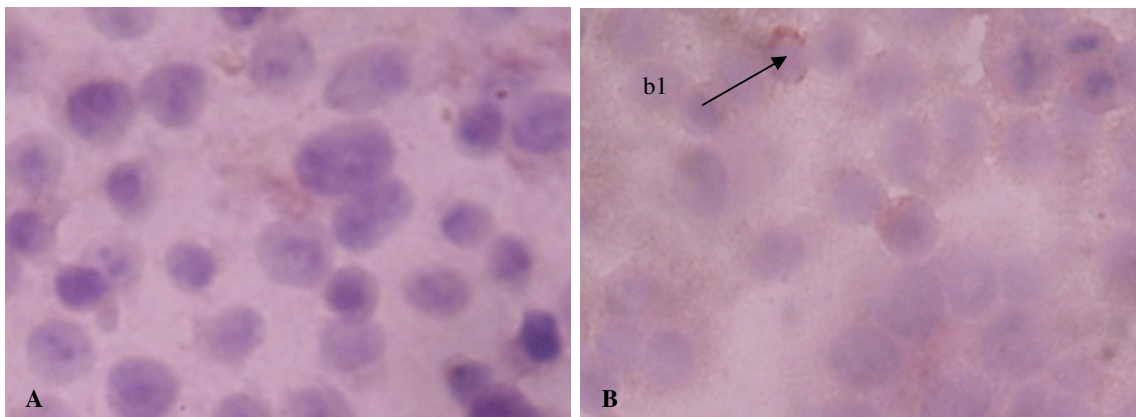
Berdasarkan data di atas disimpulkan bahwa terjadi perbedaan ekspresi *caspase-3* antara kelompok perlakuan dan kontrol, dan perbedaan tampak jelas pada inkubasi 20 jam.

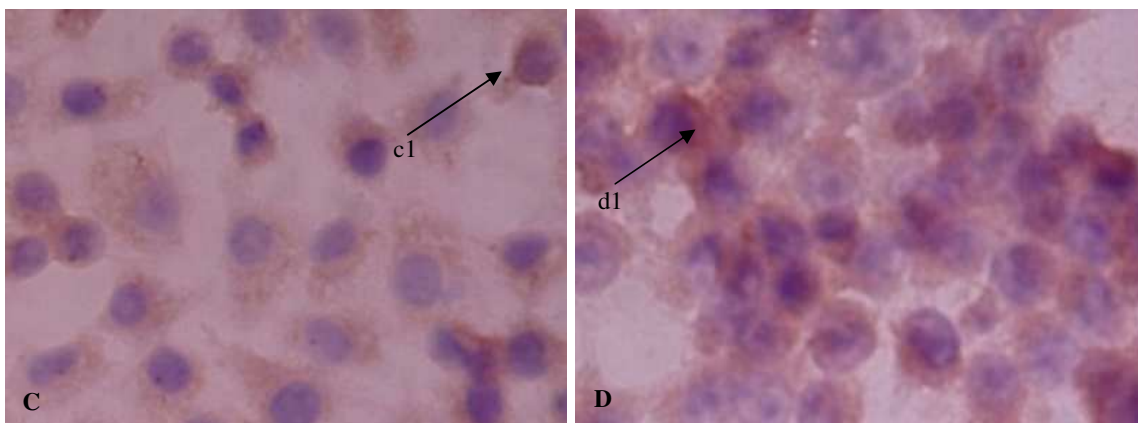
Korelasi ekspresi *p21* dan *caspase-3*

Hubungan antara ekspresi *p21* dan *caspase-3* pada kelompok perlakuan (diberi ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik) yang diinkubasi dalam 5 jam, 10 jam dan 20 jam dianalisis dengan uji korelasi pada Grafik 2.

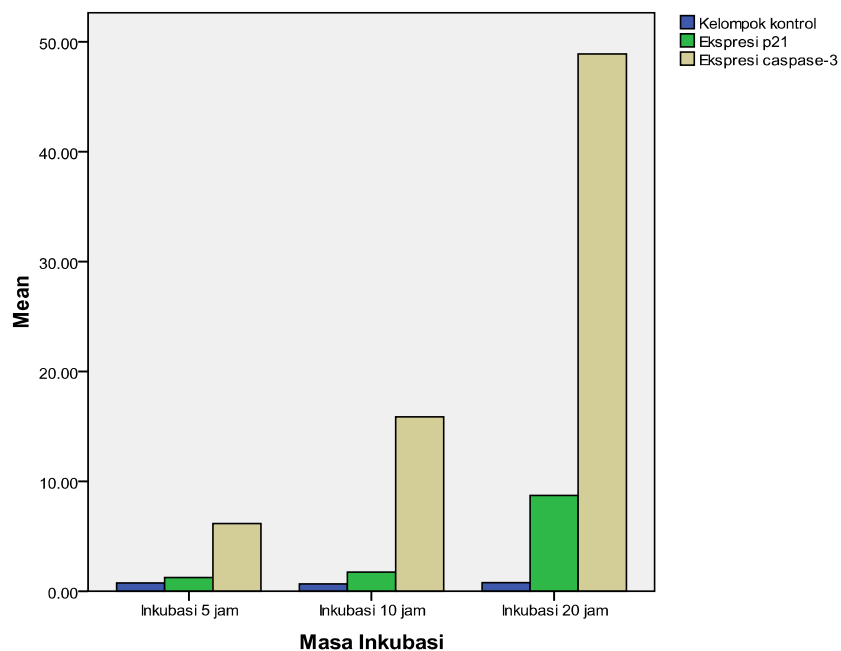


Gambar 2. Ekspresi *p21* sel MCF-7. A. Kontrol sel. a1. *p21* terekspresi pada sitoplasma. B. Kelompok perlakuan inkubasi 20 jam. C. Kelompok perlakuan dengan pembesaran 1000x. c1. *p21* terekspresi lemah dalam nucleus. c2. *p21* terekspresi sedang dalam nukleus





Gambar 3. Ekspresi *caspase-3* pada sel *MCF-7* setelah diberi perlakuan. A. Kontrol sel (tanpa perlakuan). B. Sel dengan inkubasi 5 jam. C. Sel dengan inkubasi 10 jam. D. Sel dengan inkubasi 20 jam. b1. *Caspase-3* terekspresi lemah dalam sitoplasma. c1. *Caspase-3* terekspresi sedang dalam sitoplasma. d1. *Caspase-3* terekspresi kuat dalam sitoplasma. Pengamatan dengan mikroskop cahaya, pada pembesaran 400x



Tampak terjadi peningkatan ekspresi *p21* dan *caspase-3* pada tiap waktu inkubasi, dibandingkan dengan kontrol, terutama pada inkubasi 20 jam.

Grafik 2. Perbandingan ekspresi *p21*, *caspase-3* masa inkubasi 5 jam, 10 jam dan 20 jam

Uji korelasi *Pearson* antara total skor *IDS caspase-3* dan *p21* tidak didapatkan nilai signifikan, sehingga disimpulkan tidak terdapat hubungan bermakna antara ekspresi *caspase-3* dan *p21* baik pada inkubasi 5 jam, 10 jam maupun 20 jam.

PEMBAHASAN

Uji sitotoksisitas menyimpulkan potensi ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik lebih

kuat dibandingkan dengan ekstrak daun, dengan nilai IC_{50} umbi=63,08 $\mu\text{g/mL}$, di samping itu terdapat fenomena *dose dependent* dan waktu inkubasi. Senyawa dinyatakan poten jika nilai IC_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/mL}$,²⁵ dengan demikian ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik termasuk senyawa potent. Dasar analisis nilai IC_{50} adalah persentase viabilitas sel setelah perlakuan, dimana 50% sel hidup dari jumlah total sel akibat pemberian ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik kadar

63,08 µg/mL. Hal ini diduga akibat akumulasi hambatan pertumbuhan sel dan terjadi induksi apoptosis.

Secara teoritis perubahan biokimia subseluler terjadi sebelum perubahan morfologis sel, sehingga ekspresi molekul *caspase-3* aktif diharapkan mampu menginduksi perubahan mikroskopis seluler secara apoptosis, mulai fragmentasi *DNA*, *membrane blebbing* dan pembentukan *apoptotic bodies*.^{7,8,11} Meskipun demikian keterlibatan molekul *caspase-3* dalam mentrigger apoptosis sangat berkaitan dengan keutuhan dan kemampuan genomik *caspase-3* itu sendiri. Hal ini diperkuat dalam penelitian terdahulu menggunakan substrat *DEVD*, dimana tidak terjadi peningkatan ekspresi *caspase-3* pada sel *MCF-7* yang mengalami delesi gen *CASP-3*, sebaliknya pada sel *T47D* (gen *CASP-3* normal) terjadi peningkatan ekspresi *caspase-3* dan *caspase-7*.¹⁵

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi *caspase-3* pada sel *MCF-7* yang mengalami delesi gen *CASP-3*, terutama pada inkubasi 20 jam, dengan skor *IDS caspase-3* sebesar 48,89%, dimana 14,1% ekspresi kuat (berwarna coklat tua pada sitoplasma). Peningkatan *caspase-3* aktif ini akan memecah berbagai substrat kematian diantaranya *DFF-45* (protein inhibitor)^{15,26,27} sehingga dilepaskannya *DFF40* endonuklease yang memecah *DNA* menjadi potongan-potongan *DNA* yang dikenal sebagai *apoptotic bodies*.^{7,8,11} Diduga kuatnya intensitas ekspresi *caspase-3* berkaitan dengan aktivitas katalitik *caspase-3* aktif.

Analisis ekspresi *p21* pada inkubasi 5 jam pertama setelah perlakuan, tidak dijumpai perbedaan bermakna. Diduga efek subtoksik perlakuan diawal belum mampu menginduksi *p53* mentransaktivasi *p21* nukleus, dan dominasi ekspresi *p21* sitoplasmik (terlihat pada kelompok kontrol), menjadi penyebabnya. Ekspresi *p21* mulai bermakna pada inkubasi 10 jam dengan persentase skor *IDS p21* sebesar 1,730%, dengan ekspresi lemah, dan inkubasi 20 jam sebesar 8,720%, dimana 3,77% ekspresi sedang dan ekspresi 4,95% lemah, meskipun demikian ekspresi kuat *p21* pada inkubasi 20 jam tidak dijumpai (tidak terdeteksi), diduga terjadi katalisasi *p21* nukleus oleh *caspase-3* aktif ketika sinyal apoptosis semakin menguat.

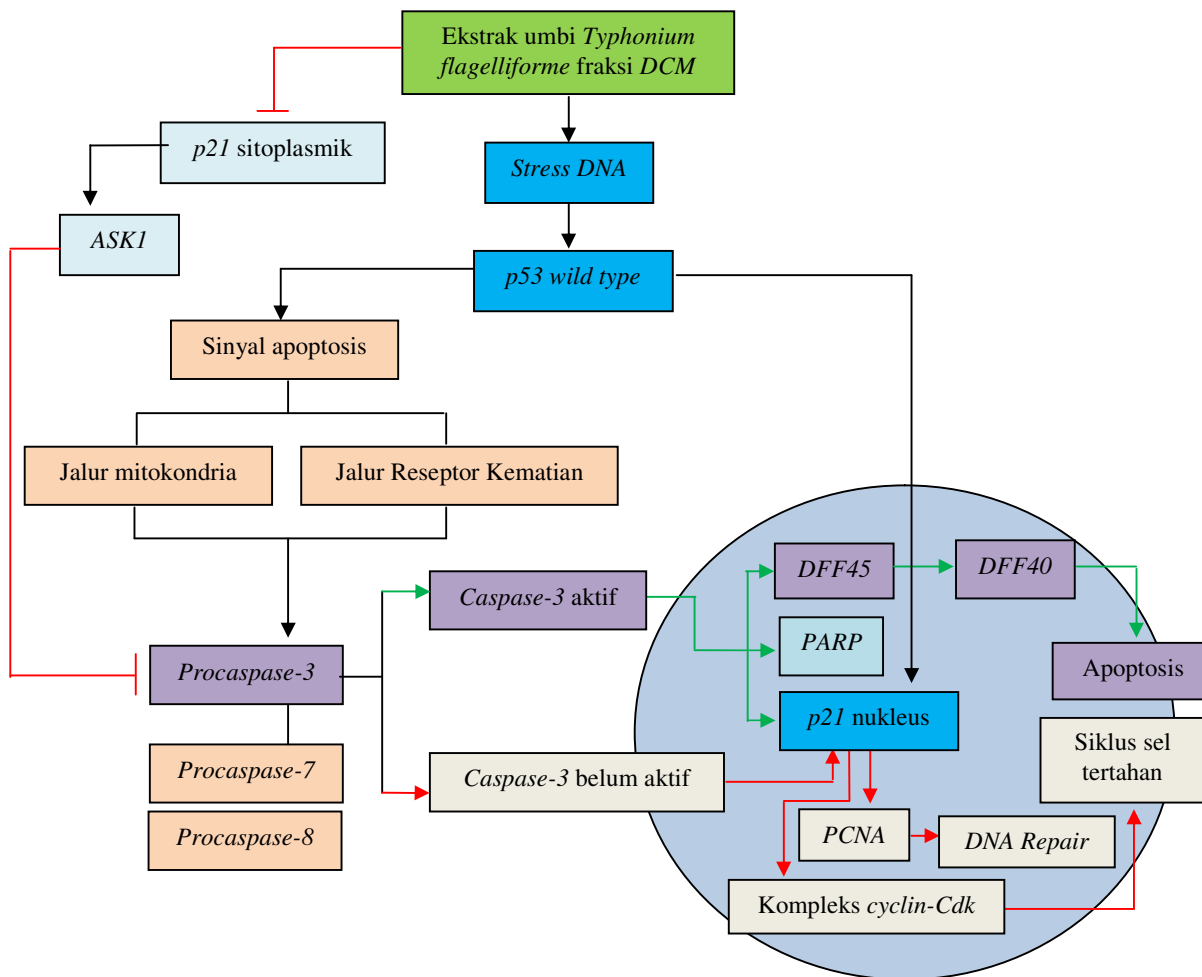
Caspase-3 aktif secara *cascade-caspase* (terekspresi kuat) pada inkubasi 20 jam, segera memecah *p21* nuklear secara gradual, sehingga terjadi penurunan persentase ekspresi *p21*. Adanya gambaran *Apoptotic bodies* pada inkubasi 20 jam (linear dengan nilai ekspresi *caspase-3* dan mendukung fakta tersebut). Untuk memudahkan bahasan kami jelaskan proses di atas secara sistematis pada Gambar 4.

Pemberian ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik kadar IC_{50} (kadar non letal) pada *cell-line* kanker payudara *MCF-7* menyebabkan gangguan subtoksik pada tingkat *DNA*. Keadaan memicu aktivasi *p53 wild type*, dengan tujuan transaktivasi *p21* yang bekerja sebagai inhibitor aktivitas kompleks *cyclin-Cdk*, sehingga siklus sel tertunda.²⁸⁻³⁰ Pada saat bersamaan *p21* nukleus menghambat aktivitas *PCNA*,³¹⁻³³ memberikan kesempatan *DNA repair* bekerja reparasi kerusakan *DNA cell-line MCF-7* yang terjadi.

Meningkatnya masa inkubasi membuat akumulasi gangguan tingkat *DNA* semakin meningkat. Hal ini menyebabkan kemampuan *DNA repair* tidak sebanding dengan jumlah gangguan *DNA*. Suatu saat ambang batas kemampuan *DNA repair* terlampaui, mengakibatkan ketidakstabilan sekwens *DNA*, berakhir dengan koplasnya garpu replikasi. Keadaan ini memicu terbentuknya sinyal apoptosis,³⁴ ditandai dengan ekspresi *caspase-3* semakin menguat, hingga suatu saat (inkubasi 20 jam) ekspresi *caspase-3* maksimal (kuat) menyebabkan terjadi pemecahan *DEFF45*, sehingga dilepaskannya *DFF40* endonuklease yang mampu memecah *DNA* menjadi potongan *DNA (apoptotic bodies)*.^{7,11}

Hal ini mengakibatkan perubahan pola biomolekuler sel *MCF-7*, yang semula status *repairing DNA*, kemudian berubah menjadi apoptosis.^{35,36} Molekul lain yang juga dipecah *caspase-3* adalah molekul *p21 nuklear* yang terus menerus dipecah ketika terjadi ekspresi *p21* nuklear maksimal (diduga ekspresi *p21* kuat pada inkubasi 20 jam) sehingga keberadaan *p21 nuklear* selalu dalam kondisi stabil^{15,37,38} dan molekul *PARP (p21 dan PARP menjadi inaktif)*. Hal ini menjelaskan mengapa *p21 dan caspase-3* sama-sama meningkat diawal, tetapi persentase *caspase-3* jauh lebih tinggi diakhir inkubasi 20 jam (seperti pada uji korelasi hubungan peningkatan *caspase-3* dan *p21* tidak bermakna). Studi terdahulu menyebutkan inaktivasi *p21* atau deplesi *p21* sitoplasmik membuat sel lebih sensitif terhadap apoptosis, meskipun dengan hanya sedikit kerusakan *DNA*.^{39,40}

Kelompok kontrol ditemukan banyak ekspresi *p21* sitoplasmik, akibat fosforilasi T¹⁴⁵ oleh AKT/PKB, mengakibatkan *NLS p21* tidak aktif, berdampak translokasi *p21 nuklear* ke sitoplasma (*p21* sitoplasmik pada kelompok kontrol). Molekul *p21* sitoplasmik ini mengaktifkan ASK1 (salah satu domain interaksi *p21*) yang berfungsi menginhibisi sinyal-sinyal apoptosis terutama *procaspase-3*, akibatnya apoptosis tidak terjadi.⁴¹⁻⁴³ Pemberian ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik pada *cell-line MCF-7* menyebabkan berkurangnya *p21* sitoplasmik dan meningkatnya *p21* nukleus.



Gambar 4. Kemampuan *caspase-3* aktif dalam mengkatalisasi *p21* nukleus dan substrat kematian lainnya setelah pemberian ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik.

Hal ini berkontribusi dalam terjadinya apoptosis, seperti disebutkan dalam studi terdahulu, dimana overekspresi *p21* sitoplasmik menyebabkan sel lebih resisten terhadap pengobatan kemoterapi.^{44,45}

Berdasarkan hal di atas, kemampuan ekspresi *caspase-3* dan *p21* berkaitan dengan senyawa yang terkandung dalam ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik, berupa *linoleic acid*, *hexadecanoic acid* dan *9-hexadecanoic acid* yang tinggi,²² yang merupakan kandungan lemak tak jenuh terkonjugasi, dan diduga merupakan zat poten yang mampu menghambat pertumbuhan tumor invitro dan menginduksi apoptosis.⁴⁶

SIMPULAN

Ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik mampu meningkatkan ekspresi *caspase-3*, ekspresi *p21* nukleus dan deplesi *p21* sitoplasmik pada

cell-line kanker payudara *MCF-7* yang mengalami delesi gen *CASP-3*.

SARAN

Ekstrak umbi *Typhonium flagelliforme* fraksi diklorometanolik memiliki prospek baik untuk dikembangkan sebagai agen kanker, sehingga perlu dilakukan penelitian dengan kadar lebih rendah dan tinggi dari IC_{50} , untuk membandingkan tingkat ekspresi protein *p21* dan *caspase-3*, memperpanjang masa inkubasi untuk membuktikan terjadi penurunan ekspresi *p21* dan mendapatkan ambang batas penurunan ekspresi *p21* diikuti dengan peningkatan apoptosis. Pemeriksaan mikroskopis apoptosis, pemeriksaan elektroforesis dan *flowcytometry* untuk membuktikan morfologis apoptosis, struktur molekul protein *caspase-3* dan *p21*. Pemeriksaan *DNA repair* untuk melihat fungsi reparasi kerusakan *DNA*. Pemeriksaan protein jalur apoptosis, menilai jalur aktivasi kaskade *caspase-3*.

DAFTAR PUSTAKA

1. International agency for research on cancer. World Cancer Report. June 2003. <http://www.iarc.fr/en/publications/PDFs-online/word-cancer-report.retrived> 2009-03-26.
2. "Fact sheet No. 297: Cancer. World Health Organization. February 2006. <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs297/en/indexhtml> retrieved 2009-03-26.
3. Sugito H. Kanker di Indonesia tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed. Dep. Kes RI; 1994:3-6.
4. Slamon DJ, Leyland JB, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001, 344(11):783-92.
5. Harper LJ, Costea DE, Gammon L, Fazil B, Biddle A and Mackenzie IC. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase associated with apoptotic resistance. *BMC Cancer.* 2010(10):1471-07.
6. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene.* 2005(24): 5137-48.
7. Allan LA and Clarke. Apoptosis and autophagy: regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* 2009(276):6063-73.
8. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apof-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.*2010,(123):3209-14.
9. Abrahams VM, Kamsteeg M, and Mor G. The fas/fas ligand system and cancer. *Mol Biotec.* 2003(25):19-30.
10. Lavrik I, Golks A and Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005 (118):265-7.
11. Taylor RC, Cullen SP and Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Molecular cell biology.* 2008(8):231-41.
12. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science.*1998(281):1312-6.
13. Stennicke HR, Renatus M, Meldal M, and Salvesen GS. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J.* 2000 (350):563-8.
14. Garcia C M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, et al. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ.* 1999(6):362-9.
15. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, and Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological change associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998(273): 9357-60.
16. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993 (75):805-16.
17. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 (75):817-25.
18. Zhang Y, Fujita N, and Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999(18):1131-8.
19. Oren M. Decision Making by p53: Life, Death and Cancer. *Cell Death Differ.* 2003(10):431-42.
20. Neoh CK. A promising local plant in the fight against cancer. *Med J. Malaysia.* 1992(47):86-8.
21. Choon SL, Rosemal HMH, Nair NK, Majid MIA, Mansor SM, Navaratnam V. Typhonium flagelliforme inhibits cancer cell growth in vitro and induce apoptosis: An evaluation by the bioactivity guided approach. *J Ethnopharmacol.* 2008(118):14-20.
22. Syam M, Bustamam A, Ibrahim S, Al-Zubairi AS, Aspollah M, Abdullah R, et al. In vitro ultra-morphological assessment of apoptosis on CEMss induced by linoleic acid-rich fraction from *Typhonium flagelliforme* Tuber. *eCAM.* 2010:1-13.
23. Syam M, Bustamam A, Ibrahim S, Al-Zubairi AS, Aspollah M. Typhonium flagelliforme induces apoptosis in CEMss cells via activation of caspase-9, PARP cleavage and cytochrome c release *J.Ethnopharmacol.* 2010,131(3):592-600.
24. Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, et al. Subcellular localization of cyclin B, Cdc2 and p21^{WAF1/CIP1} in breast cancer: association with prognosis. *Eur J Cancer.* 2001(37):2405-12.
25. Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, Tran QL, Tran QK, Harimaya Y, et al. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* 2002 25(6):753-60.
26. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, and Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998(391):43-50.
27. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol Chem.* 1999 (43):30651.
28. Pollard TD and Earnshaw WC. *Cell biology: cell cycle.* Philadelphia: Elsevier Science. 2002:673-8.
29. Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma irradiation. *Proc Natl. Acad. Sci.* 1999(96):1002-07.
30. Javelaud D, Besancon F. CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). *Atlas genet cytogenet oncol haematol.* April 2001. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes?CDKN1AID139.html>, disitasi 14 Maret 2011.
31. Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Embo J.* 1987 (6):637-42.
32. Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.*1992(2):367-74.

33. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol. Cell. Biol.* 2005(21):9350.
34. Ewald B, Sampath D and Plunkett. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene.* 2008(27):6522-37.
35. García Z, Kumar A, Marqués M, Cortés I and Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J.* 2006 (25):655-61.
36. Dotto GP. p21(WAF1/Cip): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta.* 2000(1471):43-56.
37. Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999 (18):1131-8.
38. Jin HY, Yoo KJ, Lee YH, and Lee SK. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 Associated with the cyclin a-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *The Biol Chem.* 2000(275):30256-63.
39. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 2005(65):3980-85.
40. MacFarlane M, Cain K, Sun XM, Alnemri ES and Cohen GM. Processing/activation of at least four interleukin-1 β converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *J. Cell Biol.* 1997(137):469-79.
41. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1999(18):1223-34.
42. Zhan J, Easton JB, Huang S, Mishra A, Xiao L, Lacy ER, et al. Negative regulation of ASK1 by p21^{Cip1} involves a small domain that includes serine 98, that is phosphorylated by ASK1 in vivo. *Mol Cell Biol.* 2007(27):3530-41.
43. Abukhdeir AM, Park BH. p21, and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2005(10):19.
44. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21 (waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate.* 1999 (39): 8-15.
45. Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N, Lohrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *BJ Cancer.* 1999(80):546-55.
46. Li-Shu Wang LS, Huang YW, Liu S, Yan P and Lin YC. Conjugated linoleic acid induces apoptosis through estrogen receptor alpha in human breast tissue. *BMC Cancer,* 2008(8):208.