

ARTIKEL PENELITIAN

Efek Ekstrak Etanol *Oryza sativa L. indica* terhadap Aktivitas Protein Kinase B dan Kadar CA 15-3 Serum pada Tikus *Sprague dawley* Betina

Zanuar Abidin

Departemen Biokimia FK Universitas Muhammadiyah Surabaya

Korespondensi: zanuhadisuratno@gmail.com
Diterima 4 Juni 2016; Disetujui 11 Desember 2016
DOI: 10.23886/ejki.4.6701.187-90

Abstrak

Beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) merupakan bahan pangan yang mengandung polifenol dan antosianin dalam kadar tinggi, mempunyai potensi sebagai antikanker, dan mencegah resistensi terhadap terapi doksorubisin akibat hiperaktivasi jalur phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan menganalisis potensi beras hitam dalam menghambat jalur PI3K. Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Juni 2016 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga menggunakan tikus putih *Sprague dawley* betina berumur 7–8 minggu sebanyak 30 ekor. Kanker payudara diinduksi menggunakan kombinasi 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) dan estrogen selama 3 minggu. Tikus dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu K1 (placebo), K2 (doksorubisin), dan P (doksorubisin dan ekstrak beras hitam). Ekstrak etanol beras hitam diberikan dengan dosis 75mg/kgBB/hari selama enam minggu. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah aktivitas protein kinase B (PKB) dan kadar CA 15-3 serum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum ($p < 0,05$). Kelompok tikus yang mendapatkan terapi kombinasi doksorubisin dan ekstrak etanol beras hitam mempunyai aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum paling rendah di antara kelompok yang lain. Ekstrak etanol beras hitam dapat menurunkan aktivitas PKB dan CA 15-3 serum pada tikus putih model kanker payudara.

Kata kunci : kanker payudara; beras hitam; PKB; CA 15-3 serum.

Effect of Ethanol Extract of *Oryza sativa L. indica* on Protein Kinase B Activity and CA 15-3 Serum Level in Female *Sprague dawley* Rats

Abstract

Oryza sativa L. indica or black rice is a food containing high level of polyphenol and anthocyanin that has potency as anticancer and prevent resistance of doxorubicin therapy as a result of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) hyperactivation. This study aimed to analyze the potency of black rice to inhibit the PI3K pathway. The study was done on March-June 2016 at faculty of veterinary Universitas Airlangga using 30 female *Sprague dawley* rats aged 7-8 weeks. Breast cancer induced by 7,12- dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) and estrogen. Rats were divided into three groups: K1 (placebo), K2 (doxorubicin), and P (doxorubicin and black rice ethanol extract). Black rice ethanol extract was given with dose of 75mg/kg weight/day for six weeks. Parameters used in this study were the activity of PKB and CA 15-3 serum level, The results showed that there was significant difference in activity of PKB and CA 15-3 serum level between the groups ($p < 0.05$). The group of rats that treated by combination doxorubicin and black rice ethanol extract had the lowest activity of PKB and CA 15-3 serum level among the other groups. The conclusion of the study is that black rice ethanol extract can decrease the activity of PKB and CA 15-3 serum level in white rat modelled breast cancer

Keywords: breast cancer; black rice; PKB; CA 15-3 serum.

Pendahuluan

Respon terapi kanker payudara terhadap kemoterapi menggunakan doksorubisin pada tahap awal sebesar 43% dan akan menurun menjadi 28% pada pemberian terapi selanjutnya.¹ Penurunan respon terapi doksorubisin terjadi karena beberapa mekanisme, yaitu inaktivasi obat, mekanisme efluks obat, peran *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), jalur *phosphatidyl-inositol-3-kinase* (PI3K), perbaikan kerusakan DNA, dan penghambatan apoptosis.^{2,3} Jalur PI3K merupakan salah satu jalur transduksi sinyal yang berperan dalam pertumbuhan dan siklus sel.⁴ Kerusakan DNA akibat pemberian doksorubisin merangsang terjadinya fosforilasi protein kinase B (PKB) yang merupakan mediator sentral dari jalur PI3K. Hal ini menyebabkan sel kanker mengalami proliferasi yang berlebihan sehingga terjadi resistensi terapi.⁵

Jalur PI3K merupakan salah satu faktor yang penting dalam resistensi kemoterapi pada kanker payudara sehingga diperlukan penelitian mengenai terapi yang dapat menghambat aktivitas jalur PI3K. Antosianin merupakan senyawa pigmen golongan flavonoid yang dapat berfungsi sebagai anti-oksidan, anti-inflamasi, anti-proliferasi, induktor apoptosis, anti-angiogenesis, anti-invasi, serta anti-metastasis.⁶ Antosianin juga dapat mencegah resistensi kemoterapi dengan menghambat kerja PI3K. Hal ini dilakukan dengan cara memblok secara langsung PI3K sehingga tidak terjadi transduksi sinyal lebih lanjut.⁷

Tanaman yang mengandung senyawa fenol dan antosianin dalam kadar tinggi adalah spesies *Vaccinium* (seperti *blueberry*, *cranberry*, dan *bilberry*), anggur, apel, beras hitam (*Oryza sativa L. indica*), terong, dan kubis merah.⁶ Beras hitam merupakan bahan pangan yang banyak ditemukan di negara berkembang dan 95% diproduksi oleh negara kawasan Asia.⁸ Beras hitam mempunyai kandungan senyawa fenol dan antosianin yang lebih tinggi dari jenis beras lainnya, seperti beras putih dan beras merah.

Penelitian eksperimental ini disusun untuk mengidentifikasi potensi beras hitam dalam menghambat jalur transduksi sinyal PI3K. Jalur PI3K mempunyai mediator sentral berupa PKB yang akan menjadi salah satu parameter dalam penelitian ini. Peran senyawa fenol dan antosianin sebagai antikanker dapat dilihat dengan mengukur penanda tumor CA 15-3 yang merupakan glikoprotein yang disekresikan oleh sel epitel kelenjar payudara.⁹

Metode

Penelitian ini menggunakan rancangan *randomized post-test only control group design* yang menggunakan hewan coba berupa tikus putih *Sprague dawley* betina berumur 7 – 8 minggu sebanyak 30 ekor. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2016 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini telah mendapat kelaikan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan nomor 550-KE pada tanggal 24 Maret 2016. Induksi kanker dengan pemberian DMBA subkutan pada payudara dengan dosis 10mg/kgBB diberikan sebanyak sepuluh kali dengan pemberian setiap dua hari sekali dan pemberian estrogen 20.000IU/kgBB intramuskular diberikan sebanyak lima kali dengan pemberian setiap empat hari sekali.¹⁰ Hewan coba dipalpasi pada payudara tiap satu minggu sekali untuk melihat perkembangan kanker payudara yang ditandai dengan terbentuknya nodul di daerah payudara tikus putih. Tikus mendapatkan terapi berupa doksorubisin dan atau ekstrak etanol beras hitam setelah induksi kanker payudara selesai dilakukan. Tikus dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok K1 mendapatkan placebo CMC-Na 0,5%, kelompok K2 mendapatkan terapi doksorubisin *single dose* dengan dosis 5mg/kgBB, kelompok P mendapatkan terapi doksorubisin *single dose* dengan dosis 5mg/kgBB dan ekstrak etanol beras hitam dengan dosis 75mg/kgBB/hari selama enam minggu.

Nekropsi tikus dilakukan pada tahap akhir penelitian. Jaringan kanker payudara tikus diambil dan digunakan untuk pemeriksaan aktivitas PKB. Darah intrakardial diambil untuk pemeriksaan kadar CA 15-3 serum. Pemeriksaan aktivitas PKB dilakukan dengan menggunakan metode imunohistokimia dan diukur berdasarkan skor imunoreaktif yang ditentukan oleh hasil perkalian skor persentase jumlah sel yang mengekspresikan PKB dengan intensitas warna pengecatan. Kadar CA 15-3 serum diukur dengan menggunakan metode ELISA. Hasil data dioleh dengan menggunakan SPSS 16 dengan analisis deskriptif dan analisis inferensial.

Hasil

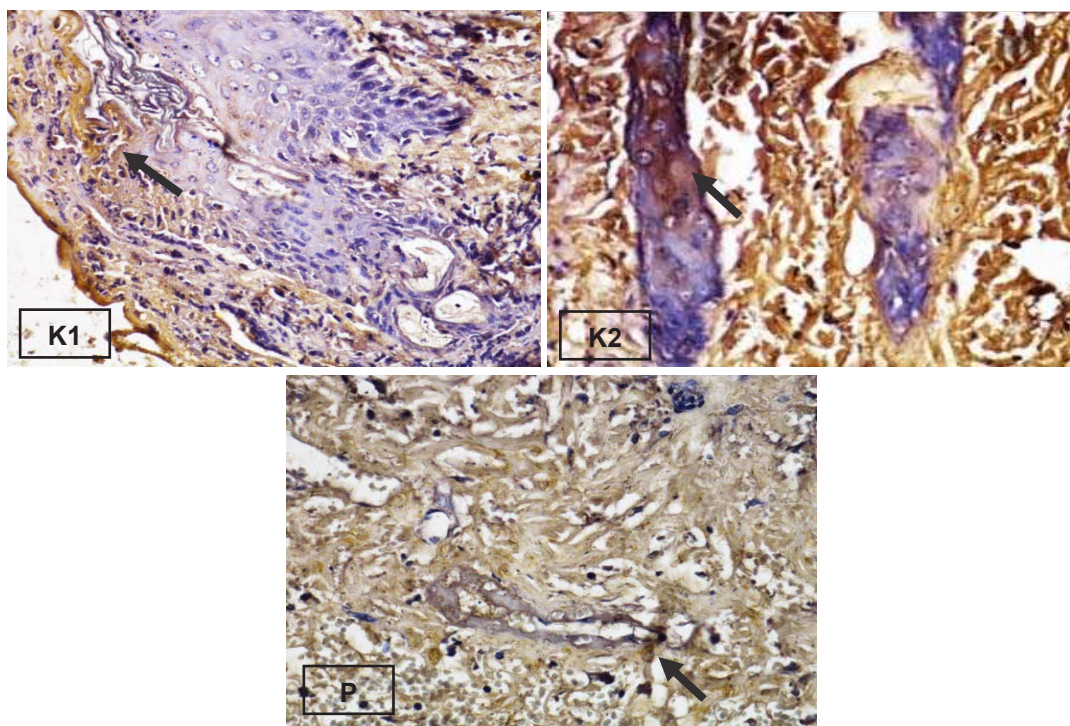
Skor aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum paling rendah didapatkan pada kelompok P (Tabel 1). Analisis data aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum, dengan menggunakan Mann-Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang

bermakna antar kelompok ($p < 0,05$) untuk setiap hasil pengukuran. bahwa terdapat perbedaan yang bermakna aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum antara masing-masing kelompok K1, K2, dan P.

Tabel 1. Aktivitas PKB dan Kadar CA 15-3 Serum

Kelompok	Skor Aktivitas PKB	Kadar CA 15-3 serum (IU/ml)
K1	$8,84 \pm 1,44$	$28,84 \pm 5,31$
K2	$11,4 \pm 1,78$	$17,77 \pm 5,81$
P	$5,42 \pm 2,71$	$6,34 \pm 2,58$

Hasil pengecatan imunohistokimia aktivitas PKB pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1. Sel kanker yang positif atau mengekspresikan PKB terfosforilasi akan memberikan warna coklat, sedangkan sel kanker yang negatif atau tidak mengekspresikan PKB terfosforilasi akan menunjukkan warna kebiruan. Skor aktivitas PKB merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel kanker yang positif atau mengekspresikan PKB terfosforilasi dengan skor intensitas warna hasil pemeriksaan imunohistokimia. Kelompok K2 merupakan kelompok yang mempunyai persentase sel positif paling tinggi dan intensitas warna coklat kehitaman paling kuat



Gambar 1. Perbandingan Ekspresi PKB antar Kelompok. Pengecatan imunohistokimia, Pembesaran 400X. Anak Panah Menunjukkan Sel yang Mengekspresikan PKB Terfosforilasi (warna coklat).

Pembahasan

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi yang bersifat sitotoksik dan dapat berinterkalasi dengan DNA. Pemberian doksorubisin menyebabkan kerusakan DNA yang akan merangsang perbaikan DNA melalui peran enzim DNA-PK. Enzim DNA-PK dapat menyebabkan hiperaktivasi jalur PI3K. Enzim PI3K mengkatalisis fosforilasi fosfatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2) menjadi fosfatidylinositol 4,5-triphosphat (PIP3). Pembentukan PIP3 menyebabkan fosforilasi PDK1 yang akan memfosforilasi residu tirosin dari PKB sehingga PKB menjadi aktif. Hiperaktivasi jalur PI3K menyebabkan

peningkatan PKB. Penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok K2 mempunyai aktivitas PKB paling tinggi di antara kelompok lain. Hal ini sesuai dengan penelitian Wallin dkk⁹ yang menyatakan bahwa doksorubisin dapat meningkatkan aktivitas PKB pada sel kanker payudara.^{4,5,11,12}

Ekstrak etanol beras hitam mengandung antosianin yang merupakan senyawa golongan flavonoid yang dapat berperan dalam menghambat jalur PI3K. Hiperaktivasi jalur PI3K yang disebabkan oleh doksorubisin dapat dihambat oleh antosianin sehingga peningkatan fosforilasi PKB dapat dicegah. Antosianin merupakan

senyawa flavonoid yang mempunyai efek sitotoksik terhadap kanker dan dapat bekerja secara sinergis dengan agen kemoterapi, termasuk doxorubisin. Penghambatan antosianin beras hitam dalam menghambat jalur PI3K ditunjukkan dengan aktivitas PKB yang lebih rendah pada kelompok P bila dibandingkan kelompok K2 dan K1. Hal ini sesuai dengan penelitian Luo dkk¹⁵ (2014) yang menyatakan bahwa beras hitam dapat mencegah jalur transduksi sinyal yang mempromosikan proliferasi dan antiapoptosis, termasuk jalur PI3K. Penelitian Adam dkk¹⁶ juga membuktikan peran ekstrak blueberry dalam mencegah pertumbuhan dan metastasis sel kanker payudara. Ekstrak blueberry yang mengandung antosianin dapat menghambat jalur PI3K sehingga dapat menurunkan fosforilasi PKB. Penurunan fosforilasi PKB menyebabkan penurunan proliferasi sel dan peningkatan apoptosis hingga jumlah sel yang memproduksi glikoprotein CA 15-3 semakin sedikit. Hal ini dibuktikan dengan kadar CA 15-3 serum paling rendah pada kelompok yang mendapatkan tambahan terapi beras hitam.^{4,5,12-16}

Senyawa fenol dalam ekstrak etanol beras hitam dapat mencegah pertumbuhan kanker karena dapat menurunkan aktivitas siklin dan menghambat jalur ERK, JNK, MAPK, NF- κ B dan AP1. Antosianin dalam ekstrak etanol beras hitam dapat menghambat jalur PI3K. Penghambatan jalur PI3K oleh ekstrak etanol beras hitam menyebabkan penurunan fosforilasi PKB sehingga terjadi penurunan aktivitas proliferasi dan antiapoptosis. Antosianin juga dapat menurunkan aktivitas protein siklin, NF- κ B dan AP1.^{4,6,17,18}

Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol beras hitam dapat menurunkan aktivitas PKB dan kadar CA 15-3 serum.

Daftar Pustaka

1. Abuhammad S, Zihlif M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*. 2013;101:213–20.
2. Marquette C, Nabell L. Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13(2):263-75.
3. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. 2014;6(3):1769-92.
4. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*. 2013;6(1):1.
5. Wallin JJ, Guan J, Prior WW, Edgar KA, Kassees R, Sampath D, et al. Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer. *Science translational medicine*. 2010;2(48):48-66.
6. Joshi Y, Goyal B. Anthocyanins: a lead for anticancer drugs. *Int J Res FarmChem*. 2011;1(4):1119-26.
7. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*. 2008;269(2):281-90.
8. Pengkumsri N, Chaiyasut C, Saenjum C, Sirilun S, Peerajan S, Suwannalert P, et al. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2015;35(2):331-8.
9. Di Gioia D, Dresse M, Mayr D, Nagel D, Heinemann V, Stieber P. Serum HER2 in combination with CA 15-3 as a parameter for prognosis in patients with early breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2015;440:16-22.
10. Pratinitya S, Roosdiana A, Oktaviane DA. Pengaruh induksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) multiple low dose (MLD) terhadap estrogen pada serum darah tikus (*Rattus norvegicus*) [Laporan Penelitian]. Malang: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya; 2013.
11. Ranasasmita R. Aktivitas anti kanker ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* pada tikus betina yang diinduksi DMBA [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2008.
12. Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;85(1):1-2.
13. Sadeghi-Aliabadi H, Mosavi H, Miran M, Kakhki S, Zarghi A. The cytotoxic and synergistic effects of flavonoid derivatives on doxorubicin cytotoxicity in Hela, MDA-MB-231, and HT-29 cancer cells. *Iranian Journal of Toxicology*. 2012;5(15):558-64.
14. Lewandowska U, Gorlach S, Owczarek K, Hrabec E, Szewczyk K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:528-40.
15. Luo LP, Han B, Yu XP, Chen XY, Zhou J, Chen W, et al. Anti-metastasis activity of black rice anthocyanins against breast cancer: analyses using an ErbB2 positive breast cancer cell line and tumoral xenograft model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;15(15):6219-25.
16. Adam LS, Phung S, Yee N, Chen S. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *Cancer Res*. 2010;70:3594 – 605.
17. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*. 2006;26(6):747-66.
18. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res*. 2008;52(5):507-26.