

Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, M.Kes.
Dr. dr. Indranila Kustarini Samsuria, Sp.PK (K)

A black and white photograph of a hand holding a complex molecular model. The model consists of numerous spheres of varying sizes connected by rods, representing atoms and bonds. The hand is positioned at the bottom, with fingers gripping the structure. The background is a light, textured surface.

ASPEK DASAR MOLEKULER PROLIFERASI DAN APOPTOSIS

TEORI DAN APOPTOSIS



Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, M.Kes.
Dr. dr. Indranila Kustarini Samsuria, Sp.PK (K)

ASPEK DASAR MOLEKULER PROLIFERASI DAN APOPTOSIS

Teori dan Apoptosis



PENERBIT ALFABETA BANDUNG

UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA NOMOR 19 TAHUN 2002
TENTANG HAK CIPTA PASAL 72 KETENTUAN PIDANA
SANKSI PELANGGARAN

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak mengumumkan atau memperbanyak suatu ciptaan atau memberikan izin untuk itu, dipidana dengan pidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyerahkan, menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara.

kan
me
(pe
pe
sa
Fe
r
k
a
r

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang keras memperbanyak, memfotokopi sebagian atau seluruh isi buku ini, serta memperjualbelikannya tanpa mendapat izin tertulis dari Penerbit.

© 2018, Penerbit Alfabeta, Bandung

Bio17 (x + 86) 16 x 24 cm

Judul Buku : Aspek Dasar Molekuler Proliferasi dan Apoptosis
Teori dan Apoptosis

Penulis : Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, M.Kes.
Dr. dr. Indranila Kustarini Samsuria, Sp.PK (K)

Desain Cover : Rieva Delviori

Penerbit : **ALFABETA** cv
Jl. Gegerkalong Hilir No. 84 Bandung
Telp. (022) 200 8822 Fax. (022) 2020 373
Website: www.cvalfabeta.com
Email: alfabetabdg@yahoo.co.id

Cetakan Kesatu : Maret 2018

ISBN : 978-602-289-388-2

Anggota Ikatan Penerbit Indonesia (IKAPI)

DAFTAR ISI

PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	vii

BAB I

DEFINISI DAN KONSEP DASAR PROLIFERASI DAN APOPTOSIS	1
1.1. Dasar Proliferasi Sel	1
1.2. Dasar Apoptosis Sel	5
DAFTAR PUSTAKA	8

BAB II

PROSES REGULASI DAN SIKLUS SEL, MEKANISME PROLIFERASI SEL DAN JALUR APOPTOSIS SEL	11
2.1. Siklus Sel	11
2.2. Proliferasi Sel	15
2.3. Apoptosis	19
2.3.1. Jalur Apoptosis	22
2.3.1.1. Jalur Mitokondria (<i>Mitochondria Pathway</i>)	23
2.3.1.2. Jalur Reseptor Kematian (<i>Death Receptor Pathway</i>)	26
2.3.1.2.1. Jalur Kematian CD95/CD95L	27
2.3.1.2.2. Jalur Kematian TNFR	29
DAFTAR PUSTAKA	32

BAB III

PERAN PROTEIN APOPTOSIS	36
3.1. Peran Protein Apoptosis	36
3.1.1. Peran P53	36
3.1.2. Peran Protein Bcl-2, Protein BAX dan Peran Caspase (<i>Cystein-Dependent Aspartat-Directed Protease</i>)	42
3.1.2.1. Protein Bcl-2	42
3.1.2.2. Protein BAX	48
3.1.3. Peran Caspase (<i>Cystein-Dependent Aspartat-Directed Protease</i>)	48
DAFTAR PUSTAKA	51

BAB IV

PENGHAMBATAN PROLIFERASI DAN APOPTOSIS

DALAM APLIKASI DUNIA RISET

DAN PENELITIAN ILMIAH	56
4.1. Penghambatan Proliferasi Sel oleh Polifenol	56
4.2. Penghambatan Apoptosis oleh Polifenol	63
DAFTAR PUSTAKA	66

BAB V

TEKNIK MOLEKULER PROLIFERASI

DAN APOPTOSIS DALAM PENELITIAN ILMIAH

5.1. Dasar Teori	74
5.1.1. Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR	75

5.1.2. Prosedur Pewarnaan AgNORs (<i>Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions</i>)	76
5.2. Dasar Teori	77
5.2.1. Pewarnaan Sel Apoptosis dengan TUNEL	78
5.2.2. Pewarnaan Sel Apoptosis Dengan TUNEL Prosedur Pewarnaan TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> <i>dUTP nick end labeling</i>)	79
DAFTAR PUSTAKA	81
TENTANG PENULIS	82

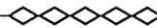
BAB I

DEFINISI DAN KONSEP DASAR PROLIFERASI DAN APOPTOSIS

Standar Kompetensi

Sesudah mempelajari Bab ini, mahasiswa diharapkan dapat:

1. Menjelaskan konsep dasar proliferasi sel
2. Menjelaskan konsep dasar apoptosis sel



1.1. Dasar Proliferasi Sel

Kanker adalah proliferasi sel yang berlebih-lebihan, tak terkendali, tak mengikuti kaidah-kaidah pertumbuhan sel normal. Proliferasi berlebihan ini terjadi akibat mutasi gen. Mutasi genetik timbul secara bertahap, akibat *hit* yang merubah urutan nukleotida (*multihit theory*). Pertumbuhan sel normal dipengaruhi oleh keseimbangan antara onkogen, *tumor suppressor gen*, *repair gene* dan *apoptosis gene*. Onkogen merupakan gen yang merangsang proliferasi sel, sedangkan *tumor suppressor gen* menghambat proliferasi. Dengan demikian aktifitas proliferasi sel

dipengaruhi oleh ekspresi onkogen, tumor *suppressor* gen maupun *repair gene* dan *apoptosis gene*. Hasil dari aktivitas berbagai gen tersebut menyebabkan proliferasi sel yang tak terkendali, secara klinik tumbuh benjolan (kanker) yang pada akhirnya berkembang menjadi stadium lanjut (Constantinides P, 1994; Derenzini M, 1994; Derenzini M and Trere D, 2000).

Selama ini kanker berdiferensiasi jelek dianggap mempunyai prognosis lebih buruk oleh karena diduga mempunyai aktivitas proliferasi sel lebih tinggi dibanding diferensiasi baik. Untuk menilai aktivitas proliferasi pada keganasan kanker belum digunakan pendekatan tingkat molekuler. Berbagai penelitian pada dekade terakhir ini menunjukkan hubungan yang erat antara potensi keganasan dengan lesi di tingkat molekuler. Aktivitas proliferasi dapat dinilai baik dengan parameter statis maupun dinamis. Hitung AgNOR (*argyrophilic nucleolar organizer region*) merupakan salah satu parameter statis penilaian aktivitas proliferasi yang mudah, sederhana dan tidak mahal. Hitung AgNOR ini berupa bintik kehitaman sebagai protein yang dihasilkan oleh kromosom13 yang akan tampak dengan pengecatan perak (AgNOR) yang menggambarkan aktivitas proliferasi sel kanker (Derenzini M and Trere D, 2000; Derenzini M, *et al*, 2000; Pich A and Chiusa L, 2000).

Proliferasi merupakan salah satu sifat biologik sel yang mempunyai peran dalam mempengaruhi efek radiasi pada sel bersangkutan karena telah diketahui bahwa sel yang sensitif terhadap radiasi adalah sel dalam fase gap 2 (G2) dan mitosis (M) dalam siklus proliferasi (Tjahjono, 2002; Pich A, *et al*, 2000; Trere D, 2000; Irawan, 2008).

Proliferasi sel menghasilkan dua sel yang berasal dari satu sel. Keadaan ini membutuhkan pertumbuhan sel yang kemudian diikuti oleh pembelahan (divisi) sel. Pertumbuhan sel yang tidak

terkendali merupakan ciri khas kanker. Sel kanker secara umum berisi biomolekul yang diperlukan untuk bertahan, proliferasi, diferensiasi, kematian sel dan ekspresi tipe sel dengan fungsi khusus (*specific functions*). Kegagalan regulasi fungsi inilah yang menghasilkan perubahan fenotip dan kanker. Pada jaringan normal, proliferasi sel mengarah kepada penambahan jaringan dimana jumlah sel tidak hanya tergantung kepada proliferasi sel tetapi juga oleh kematian sel. Kematian sel terprogram (apoptosis) adalah proses dikeluarkannya sel-sel yang rusak. Keseimbangan antara produksi sel baru dan kematian sel itulah yang mempertahankan sel yang tepat pada jaringan (homeostasis) (Brody JG dan Rudel RA, 2003; Tan PH, 2001).

Proses apoptosis dapat terjadi melalui beberapa jalur. Salah satu jalur yang mempunyai kaitan erat dengan kanker adalah melalui induksi apoptosis oleh protein p53. Protein p53 merespon kerusakan DNA atau stres sel yang meliputi aktivitas onkogen (gen pendorong terbentuknya tumor), hipoksia (kekurangan oksigen dalam sel), erosi telomerase (pemendekan DNA akibat non-aktifnya enzim telomerase) dan stres sel yang lain (Stokloza T and Golab J, 2005). Aktivitas transkripsi dari p53 bergantung pada pembentukan tetramer dari protein tersebut yang berinteraksi dengan DNA dengan urutan yang spesifik (*sequence-specific*). Tiap subunit p53 terdiri dari 4 domain yang berbeda fungsinya. Residu 1 sampai residu 44 merupakan ujung N yang sedikit terlipat sebagai domain pengaktif transkripsi. Domain inti merupakan bagian yang berinteraksi dengan DNA dan berawal dari residu 102 sampai residu 292. Residu 320 sampai residu 356 bertanggung jawab atas pembentukan tetramer, sedangkan residu 356 sampai residu 393 merupakan domain regulator (Zhao K, *et al.*, 2001). Kurang lebih 55% sel tumor pada manusia kehilangan fungsi p53 akibat mutasi. Hilangnya fungsi p53 menyebabkan

kerusakan DNA atau kecacatan pada sel yang lain yang tidak diikuti dengan penghentian penggandaan dan/atau proses apoptosis meskipun terjadi kenaikan konsentrasi p53 (Bykov V. J, *et al.*, 2002; Joerger D. C, *et al.*, 2005).

Ki-67 sebagai pertanda proliferasi pertumbuhan tumor ganas sangat bervariasi dan ini mencerminkan keadaan klinisnya, begitupun, proliferasi adalah gambaran kunci progresifitas tumor. Ki-67 dikenali pertama kali oleh Gerdes *et al* tahun 1991 sebagai protein non histon. Ki-67 adalah antigen inti berhubungan dengan proliferasi yang diekspresikan pada semua tahap siklus sel, yang diekspresikan pada sel yang berproliferasi selama pertengahan fase G1, meningkat pada saat memasuki fase S dan G2, dan mencapai puncak pada fase M pada silus sel, dan dikatabolisme dengan cepat pada akhir fase M dan tidak terdeteksi pada fase G0 dan awal G1. Pengukuran proliferasi tumor menjadi sangat penting pada penelitian bidang kanker payudara. Hal ini tidak hanya disebabkan oleh karena peran indikator prognostik dari aktivitas proliferasi, tetapi juga pengukuran aktivitas proliferasi yang berperan dalam angka pertumbuhan tumor dan penilaian respon terhadap pengobatan. Marker proliferasi tumor dan angka pertumbuhan tumor dipercaya sebagai parameter prognostik baru dalam kanker payudara. Kanker payudara mengekspresikan ki67 level tinggi, suatu marker inti proliferasi sel yang berhubungan dengan *outcome* yang buruk.

1.2. Dasar Apoptosis Sel

Istilah apoptosis (*a-po-toe-sis*) pertama kali digunakan dalam makalah sekarang-klasik oleh Kerr, Wyllie, dan Currie pada tahun 1972 untuk menggambarkan bentuk morfologi yang berbeda dari kematian sel, meskipun tertentu komponen konsep apoptosis telah secara eksplisit dijelaskan bertahun-tahun sebelumnya (Kerr J.F, *et al*, 1972; Paweletz N, 2001; Kerr J.F, 2002). pemahaman kita tentang mekanisme yang terlibat dalam proses apoptosis pada sel mamalia terjadi dari penyidikan dari diprogram kematian sel yang terjadi selama perkembangan *nematoda elegans Caenorhabditis* (Horvitz, H.R, 1999).

Dalam organisme ini 1090 sel somatik yang dihasilkan dalam pembentukan dewasa *worm*, yang 131 dari sel-sel ini mengalami apoptosis atau "kematian sel terprogram." 131 ini sel-sel mati pada titik-titik tertentu selama proses perkembangan, yang pada dasarnya adalah invariant antara cacing, menunjukkan akurasi yang luar biasa dan kontrol dalam sistem ini. Apoptosis sejak itu telah diakui dan diterima sebagai modus khas dan penting "diprogram" kematian sel, yang melibatkan penghapusan ditentukan secara genetik sel. Namun, penting untuk dicatat bahwa bentuk-bentuk lain dari kematian sel terprogram telah dijelaskan dan lainnya bentuk kematian sel terprogram mungkin belum ditemukan (Formigli L, *et al.*, 2000; Sperandio S, *et al.*, 2000; Debnath J, *et al.*, 2005).

Apoptosis merupakan jalur kematian sel yang dipacu oleh mekanisme pengaturan intraseluler dimana sel yang mati mengaktifkan enzim yang mendegradasi DNA nukleus sel dan protein sitoplasma. Sel yang mengalami apoptosis, morfologinya berupa sitoplasma mengkerut, membran berbentuk gelembung, kondensasi kromatin (DNA dan protein) dan fragmentasi pada membran yang menggelembung. Apoptosis pada kondisi

fisiologis berfungsi untuk mengatur jumlah sel, proliferasi dan menghilangkan sel yang sudah tidak berguna lagi sebagai suatu perkembangan normal dari sel, seperti pada embriogenesis, hormone-dependent involution pada siklus menstruasi dan atresia folikel pada menopause, delesi sel pada proliferasi sel epitel, eliminasi sel reaktif limfosit yang berlebihan, kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik pada infeksi virus dan perkembangan tumor (Cahyanti R.D, 2008).

Apoptosis terjadi biasanya selama pertumbuhan sampai penuaan dan sebagai mekanisme homeostatis untuk mempertahankan populasi sel dalam jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan seperti di reaksi imun atau ketika sel-sel yang rusak oleh penyakit atau berbahaya agen (Norbury CJ and Hickson ID). Meskipun ada berbagai rangsangan dan kondisi, baik fisiologis dan patologis, yang dapat memicu apoptosis, tidak semua sel akan selalu mati dalam menanggapi stimulus yang sama. Iradiasi atau obat yang digunakan untuk hasil kemoterapi kanker pada kerusakan DNA di beberapa sel, yang dapat menyebabkan kematian apoptosis melalui jalur p53-dependent. Beberapa hormon, seperti kortikosteroid, dapat menyebabkan kematian apoptosis dalam beberapa sel (misalnya, *thymocytes*) meskipun sel-sel lain tidak terpengaruh atau bahkan dirangsang.

Apoptosis juga terjadi pada kondisi patologi, dimana apoptosis bertanggung jawab pada kematian sel seperti stimulasi kerusakan eksternal pada radiasi, obat sitotoksik anti-kanker, infeksi virus, atrofi patologi pada parenkim organ setelah adanya obstruksi saluran, semisal pada pankreas dan ginjal, juga kematian sel pada tumor. Disregulasi proses kematian sel ini mempunyai peranan pada patogenesis dari penyakit. Penilaian jumlah sel yang mengalami kematian karena apoptosis dinyatakan dalam indeks

apoptosis (Ghobrial IM, *et al*, 2005; Kaufmann Sh, Hengartner MO, 2001; Kumar V, *et al*, 2005).

Beberapa sel mengekspresikan reseptor Fas atau TNF yang dapat menyebabkan apoptosis melalui *ligan binding* dan *protein cross-linking*. Sel lain memiliki kematian jalur lainnya yang harus diblokir oleh faktor kelangsungan hidup seperti hormon atau faktor pertumbuhan. Ada juga isu yang membedakan apoptosis dari nekrosis, dua proses yang dapat terjadi secara independen, secara berurutan, serta secara bersamaan (Hirsch, 1997; Zeiss, 2003). Dalam beberapa kasus itu adalah jenis rangsangan dan atau tingkat rangsangan yang menentukan apakah sel-sel mati oleh apoptosis atau nekrosis. Pada dosis rendah, varietas rangsangan merugikan seperti panas, radiasi, hipoksia dan obat anti kanker sitotoksik dapat menginduksi apoptosis tetapi ini rangsangan yang sama dapat mengakibatkan nekrosis pada dosis yang lebih tinggi. Akhirnya, apoptosis adalah proses terkoordinasi dan sering energi tergantung yang melibatkan aktivasi sekelompok protease sistein disebut "*caspases*" dan kaskade kejadian yang kompleks yang menghubungkan memulai rangsangan untuk kematian akhir dari sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Brody, J.G., dan Rudel, R.A. Environmental Pollutants and Breast Cancer in Research Review. *Environmental Health Perspective* 2003; 111(8): 1007-1019.
- Bykov, V. J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P. Restoration of the Tumor Suppressor Function to Mutant p53 by a Low-Molecular-Weight Compound. *Nature Medicine* 2002; 8(3): 282-288.
- Cahyanti R.D, 2008. Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks. Semarang: Universitas Diponegoro (Master Thesis).
- Constantinides P. *General Pathobiology*. Appleton Lange; 1994: 239-85.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005; 1:66-74.
- Derenzini M. Nucleolar organizer regions in tumour cell. *The Cancer* 1994; 7:2-3.
- Derenzini M. Trere D, Pession A. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol* 2000; 191: 181-6.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000; 182:41-9.

- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:178-94.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; 15:1573-81.
- Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *CancerRes* 1999; 59:1701s-1706s.
- Irawan, 2008. Hubungan Nilai AgNOR Pra dan Pasca Kemoradiasi Dengan Respon Radiasi Pada Penderita Karsinoma Epidermoid Serviks Uteri Stadium Lanjut. Semarang: Universitas Diponegoro (Master Thesis).
- Joerger, A. C., Ang, H. C., Veprintsev, D. B., Blair, C.M., dan Fersht, A. R. (2005). Structure of p53 Cancer Mutants and Mechanism of Rescue by Second-site Suppressor Mutations. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(3): 16030.
- Kaufmann Sh, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the millennium. *Trend Cell Biol* 2001; 11:526-534.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-4.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury, and cell death. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005: p21-30.

- Norbury CJ and Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:367-401.
- Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:72-5.
- Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumour pathology. *Micron* 2000; 31: 133-41.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14376-81.
- Stokloza, T. dan Golab, J. (2005). Prospect for p53 Based Cancer Therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 52(2): 321-328.
- Tan, P.H. (2001). Pathology of Ductal Carcinoma in Situ of the Breast: A Heterogenous Entity in Need of Greater Understanding. *Annals of the Academy of Medicine*, 30 (6): 671-676.
- Tjahjono. Analisis aktivitas proliferasi pada siklus sel untuk menentukan sifat dan prognosis kanker. *M. Med. Indonesiana* 2002; 37:1-7.
- Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000; 31: 127-31.
- Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 2003; 40:481-95.
- Zhao, K., Chai, X., Johnston, K., Clements, A., dan Marmorstein, R. (2001). Crystal Structure of the Mouse p53 Core DNA-Binding Domain at 2.7Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(15): 12120-12127.

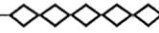
BAB II

PROSES REGULASI DAN SIKLUS SEL, MEKANISME PROLIFERASI SEL DAN JALUR APOPTOSIS SEL

Standar Kompetensi

Sesudah mempelajari Bab ini, mahasiswa diharapkan dapat:

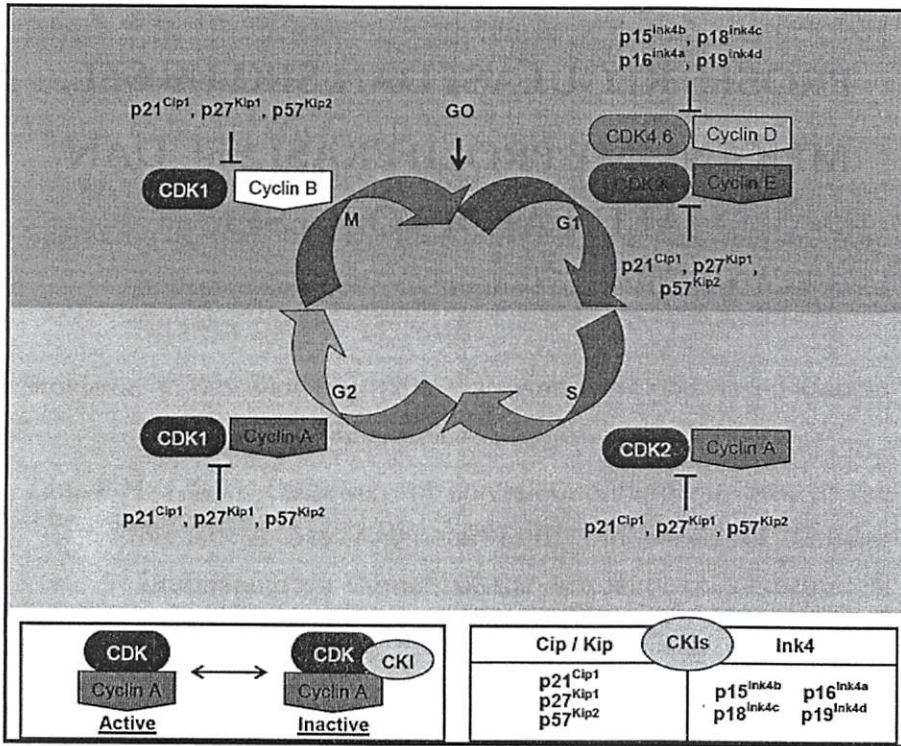
1. Menjelaskan proses regulasi dan siklus sel
2. Menjelaskan mekanisme proliferasi sel
3. Menelusuri jalur apoptosis sel baik jalur mitokondria maupun jalur reseptor kematian



2.1. Siklus Sel

Pada sel yang tidak mengalami transformasi, pembelahan selular merupakan suatu proses yang teratur dan di regulasi secara ketat serta melibatkan beberapa *checkpoint* yang menilai sinyal pertumbuhan ekstraseluler, ukuran sel, dan integritas DNA. Replikasi DNA terjadi pada fase S dan pemisahan kromosom menjadi anak keturunan (*daughter progeny*) terjadi pada mitosis (fase M). Kedua fase "gap" termasuk G₁, di mana sel

mempersiapkan diri untuk sintesis DNA, dan G₂, dimana sel mempersiapkan diri untuk mitosis (Gambar 2.1).



Gambar 2.1.

Salah Satu Sistem Regulasi Siklus Sel Pada Kanker Paru (dimodifikasi dari Rom WN, *et al*, 2000; Giacinti C, Giordano A, 2006).

Cyclin dan *cyclin-dependent kinases* (CDK) yang berhubungan adalah mesin pusat yang mengawasi progresi siklus sel. Setelah diaktivasi, cyclin/CDK membentuk kompleks yang memulai fosforilasi protein lain dan kompleks cyclin/CDK *downstream*. Perubahan pada protein tersebut, yang menyebabkan kegagalan dalam penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), kemudian dapat berfungsi sebagai pertanda dari suatu fenotipe yang lebih ganas (Singhal S, *et al*, 2005).

Transisi G₁-S. Kegagalan penghentian siklus sel pada transisi G₁-S dapat menyebabkan proliferasi seluler yang tidak terkendali (Gambar 1). Produk dari gen kerentanan retinoblastoma, Rb, berperan penting dalam transisi G₁-S. Dalam keadaan tidak terfosforilasi, Rb mencegah perkembangan dari fase G₁ menjadi S dengan mengikat faktor transkripsi kunci, E2F/DP-1. Setelah protein Rb mengalami fosforilasi oleh kompleks cyclin D/CDK, atau jika Rb mengalami mutasi atau tidak diekspresikan, E2F dilepaskan sehingga memungkinkan transkripsi dari sederetan gen yang mengatur metabolisme DNA (Dimova DK, Dyson NJ, 2005). Selain itu, molekul CDK dan cyclin lainnya juga diaktivasi. Hal tersebut kemudian memungkinkan sel untuk melewati suatu "titik restriksi" ("*restriction point*") dimana sel berlanjut ke sisa dari siklus tersebut (Singhal S, *et al*, 2005).

Up-regulasi proto-onkogen cyclin D1 diketahui penting dalam regulasi jalur siklus sel. Suatu peningkatan pada ekspresi gen tersebut memungkinkan hilangnya integritas titik restriksi G₁. Kompleks cyclin E/CDK2 juga dapat memfosforilasi Rb, serta substrat lain, dan merupakan suatu regulator penting dalam memasuki fase S siklus sel. Suatu mekanisme penting untuk regulasi aktivitas CDK melibatkan inhibitor CDK, yaitu kelas protein yang beragam yang terikat pada CDK dan menginaktivasinya. Inhibitor tersebut diatur menjadi dua famili berdasarkan struktur dan fungsi: famili Cip/Kip (p21, p27, p57) dan famili INK4 (p16, p18, p19). Meskipun fungsi inhibitor CDK bersifat kompleks, mereka umumnya dipercaya melakukan regulasi siklus sel sebagai respon terhadap sinyal inhibitor pertumbuhan, seperti kerusakan DNA, hipoksia, kelaparan serum (*starvation serum*), dan *transforming growth factor-β* (TGF-β). Inhibitor CDK p21 (juga dikenal sebagai WAF1, CIP1) menghambat progresi melewati siklus sel melalui beberapa

mekanisme. CDK p21 dapat menghambat kompleks cyclin D/CDK4 dan cyclin E/CDK2 secara awal pada G₁ dan juga dapat menghambat kompleks cyclin A/CDK2 kemudian, sebelum transisi fase S/fase G₂ (Hwang HC, Clurman BE, 2005; Pei XH, Xiong Y, 2005).

S dan G₂. Progresi melalui fase S pada prinsipnya di regulasi oleh ekspresi dan aktivitas kinase dari kompleks cyclin A/CDK2. Transisi G₂-M. *Checkpoint* utama kedua dalam siklus sel terjadi pada transisi dari G₂ ke M. Cyclin B1/Cdc2 merupakan *M phase-promoting faktor* klasik yang mendorong *entry* ke mitosis. Hubungan antara cyclin B dengan bentuk aktif Cdc2 mengawali kondensasi kromosom, destruksi membran inti, dan perakitan dari *spindle* mitosis. Regulator dari Cdc2 berperan sentral dalam *checkpoint* G₂ yang diinduksi oleh kerusakan DNA, yaitu suatu respon seluler terhadap kerusakan DNA yang memberikan waktu perbaikan dan mencegah mitosis dari sel yang rusak.

Siklus sel diatur oleh berbagai macam gen dan protein yang mana dalam keadaan normal saling berhubungan. Kelainan pada gen dan ekspresi protein gen tersebut dapat dibagi menjadi tiga, pertama adalah Proto-onkogen, gen yang termasuk dalam kelompok ini diantaranya adalah gen Her2-neu, RAS, MYC, dan CDK1. Proto-onkogen merupakan suatu gen yang berfungsi untuk meningkatkan proliferasi sel dalam keadaan normal, sehingga mengarah pada pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Yang kedua adalah gen penekan tumor yang mengalami inaktivasi, gen-gen yang termasuk dalam kelompok ini adalah BRCA1, BRCA2, dan p53 (Kumar V, *et al.*, 2010).

Terjadinya inaktivasi pada BRCA1 dan BRCA2 menyebabkan gangguan repair kerusakan sel atau DNA. Sedangkan inaktivasi pada p53, misalnya pada sel yang mengalami mutasi atau kehilangan gen p53, maka ekspresi protein

p53 tidak terjadi atau ekspresi protein p53 terjadi namun tidak dapat berfungsi sebagai pengaktivasi proses transkripsi pada beberapa gen target seperti gen inhibitor kinase *dependent-cylin* CDKN1A (p21) dan GADD45. Protein p21 yang tidak teraktivasi menyebabkan siklus sel tidak dapat berhenti pada akhir fase G1 dan GADD45 yang tidak mengalami aktivasi, menyebabkan perbaikan DNA pun tidak dapat terjadi. Juga dengan terjadinya efek proapoptosis oleh p53 yang diperantarai melalui peningkatan sintesis BAX, sehingga pada sel yang mengalami mutasi atau kehilangan gen p53 tidak mengalami aktivasi pada gen apoptosis BAX, Terjadinya inaktivasi pada BAX menyebabkan sel tidak mengalami apoptosis. Yang terakhir adalah gen pengatur apoptosis yang mengalami perubahan, seperti pada gen BAX dan BCL2. Terjadinya inaktivasi pada BAX menyebabkan sel tidak mengalami apoptosis. Selain itu perubahan fungsi inhibisi apoptosis gen BCL2 justru menimbulkan terjadinya peningkatan ekspresi gen atau over ekspresi gen tersebut, mengakibatkan sel semakin tidak mengalami apoptosis (Kumar V, *et al.*, 2010).

2.2. Proliferasi Sel

Proses proliferasi sel mamalia diatur oleh pengatur (mesin) siklus sel. Progresi siklus sel merupakan serangkaian kejadian yang dikendalikan dengan ketat yang secara positif diatur oleh *cyclin-dependent kinases* (CDKs) dan sub unit regulator siklin mereka, dan secara negatif teregulasi oleh CDK *inhibitors* (CDKIs) serta *tumour suppressor genes* (TSG). Faktor-faktor mitogenic mengikat reseptor mereka dan mengawali serangkaian peristiwa yang mengakibatkan aktivasi CDKs yang pada gilirannya mengatur perkembangan siklus sel, sintesis dan replikasi DNA serta mitosis (Motoshima H, *et al*, 2006). Meskipun sejumlah faktor pertumbuhan telah dilaporkan menggunakan jalur sinyal berbeda

untuk meningkatkan sintesis DNA, jalur sinyal tersebut diaktifkan oleh faktor-faktor pertumbuhan individu yang seharusnya berfokus pada *downstream regulators* siklus sel seperti CDKs dan CKIs. Dengan demikian jalur utama menuju transisi G₀/G₁/S merupakan CDK-terinduksi hiperphosphorilasi dari hasil gen *retinoblastoma* (Rb), yang berfungsi sebagai salah satu pengatur molekuler yang bertugas untuk mereplikasi DNA pada sel. *Hyperphosphorylation* dari Rb dihasilkan melalui faktor transkripsi E2F, yang menginduksi ekspresi gen yang diperlukan selama perkembangan melalui fase S, G₂ dan M (Weinberg RA, 1995). Dengan tidak adanya fosforilasi oleh CDKs, maka Rb mengikat dan mengisolir E2F, sehingga dapat mencegah aktivasi transkripsi dan kemudian menginduksi E2F-tergantung gen. CKIs, seperti p21CIP dan p27KIP, secara negatif mengatur proses ini dengan penghambatan aktivitas cyclin/CDKs dan fosforilasi Rb, mengakibatkan *G₁ arrest* (Hunter T, Pines J, 1994). Perkembangan siklus sel diatur oleh keseimbangan antara tingkat dan kegiatan cyclin-kompleks CDK, CKIs dan protein *suppressor* pertumbuhan lainnya seperti p53.

Suppressor tumor ekspresi p53 dan fungsinya diatur secara ketat oleh fosforilasi p53. Stres seluler, seperti γ -iradiasi dan kekurangan glukosa, menginduksi fosforilasi p53 pada Ser-15 (Jones RG, *et al*, 2005). Protein 53 yang terfosforilasi menginduksi pertumbuhan sel *arrest* dan/atau apoptosis melalui regulasi transkripsi respons gen p53 seperti p21CIP dan p53AIP1 (Bode AM, Dong Z, 2004).

Berhentinya sel saat memasuki fase pertumbuhan nol (G₀) yang terinduksi kembali setelah memasuki siklus sel oleh *growth faktor* yang berfungsi untuk menstimulasi proses proliferasi sel. Aspek spasial dan temporal merupakan ciri yang secara signifikan mengaktivasi proliferasi sel dengan jalur sinyal faktor

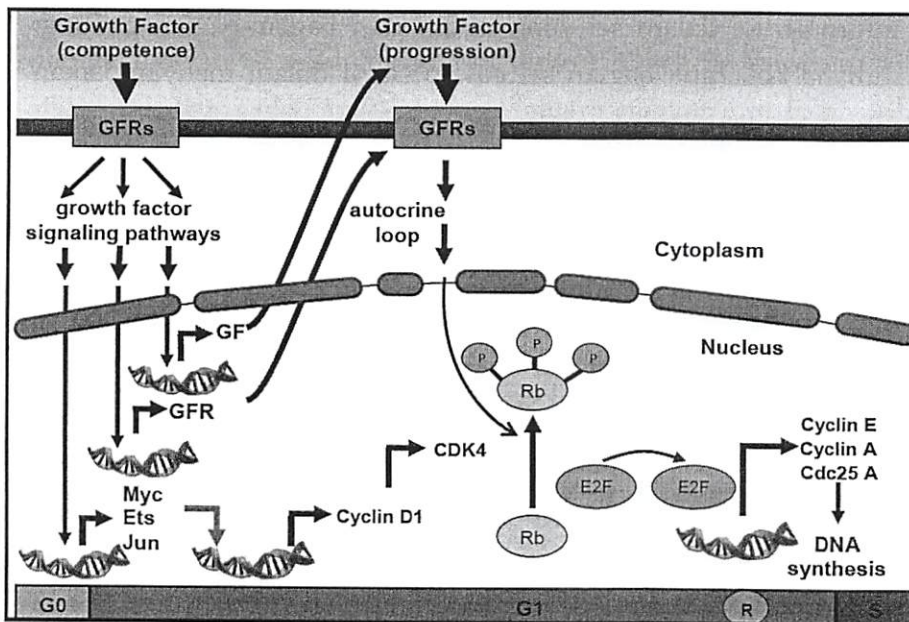
pertumbuhan (gambar 2.3). Masalah spasial berhubungan dengan fakta bahwa faktor pertumbuhan berfungsi pada permukaan sel untuk menyampaikan informasi ke sel target internal, yang banyak ditemukan pada inti sel. Sedangkan terkait masalah temporal, jalur sinyal bekerja dalam masa yang panjang dalam fase G1 (Berridge MJ, 2009). Hal ini membutuhkan waktu untuk menstimulasi sel memasuki siklus sel secara langsung selama proses miosis pada saat fertilisasi, dimana Ca^{2+} bertahan selama 2 jam sebelum zigot siap untuk memulai pertumbuhan dan perkembangan. Dengan demikian, sinyal yang disampaikan selama proses proliferasi disesuaikan dengan informasi dari receptor faktor pertumbuhan ke nucleus yang membutuhkan waktu yang lama (Bartek J, Lukas J, 2007).

Berbagai jalur sinyal digunakan untuk menyampaikan informasi ke dalam sel yang terdiri dari bagian-bagian penting, dimana beberapa bagian sel cukup stabil dalam menyampaikan informasi yang jauh ke dalam sel, sehingga dapat menyelesaikan masalah waktu yang lama. Permulaan terjadinya sinyal dipicu oleh kemampuan faktor pertumbuhan yang mengatur tahapan faktor pertumbuhan berikutnya (Berridge MJ, 2009).

Ada 2 alasan yang dapat dikemukakan sebagai solusi: pertama, mekanisme sinyal menunjukkan kepekaan yang lemah, sehingga memungkinkan sinyal terjadi dalam waktu panjang; kedua, jalur sinyal memicu cascade pada transkripsi gen yang berperan dalam melindungi informasi yang disampaikan selama fase G1. Salah satu mekanisme yang digunakan adalah dengan menginduksi ekspresi jalur sinyal lainnya yang berfungsi pada fase G1. Selama proses terjadinya transkripsi cascade, reseptor faktor pertumbuhan memberikan jalur sinyal tambahan yang menyampaikan informasi dari luar sel untuk memicu aktivitas

siklus sel yang bertanggungjawab dalam memulai sintesis DNA (Branzei D, Foiani M, 2008).

Secara singkat, faktor pertumbuhan menggunakan sejumlah mekanisme persinyalan untuk memulai proses proliferasi sel. Proses pertama dimulai dari fase G1, kemudian jalur sinyal mengirimkan informasi ke inti sel untuk memicu transkripsi cascade yang berakhir pada fosforilasi protein *retinoblastoma* (Rb) pada "titik restriksi" ("restriction point"). Jalur sinyal dependen yang berperan dalam faktor pertumbuhan, berkurang selama pada fase G1, dan berfungsi untuk memicu proses terjadinya siklus sel sampai selesai secara bertahap kemudian ke siklus sel endogen melalui mekanisme sinyal yang didasarkan pada cascade *cyclin* (Enders GH, 2008; Berridge MJ, 2009).



Gambar 2.2.

Mekanisme Proses Proliferasi Sel Pada Sel (dimodifikasi dari Berridge MJ, 2009).

Penjelasan: Proses faktor pertumbuhan diawali dengan sejumlah jalur sinyal yang mengirimkan informasi ke dalam nukleus untuk

langsung mengaktifkan gen awal. Beberapa gen ini mengkode informasi untuk ekspresi progresi *growth factors* (GFs) dan *growth faktor receptors* (GFRs) untuk membentuk *autokrin loop* untuk memicu peristiwa berikutnya. Gen awal lainnya yang mengkode faktor-faktor transkripsi seperti E-26 (ET), Jun dan Myc untuk memicu/memulai transkripsi gen berikutnya, seperti cyclin D, yang digabungkan dengan *cyclin-dependent kinases* (CDKs) untuk memfosforilasi protein retinoblastoma (Rb): salah satu kunci *gate-keepers* yang melindungi bagian tersebut melalui *restriction point* (R). Sebuah peristiwa penting pada *restriction point* (R) adalah fosforilasi Rb, yang menghilangkan penghambatan E2F dan memungkinkan faktor transkripsi E2F untuk meningkatkan ekspresi dari komponen siklus sel (misalnya cyclin E, cyclin A dan cdc25A) yang bertanggung jawab untuk memulai sintesis DNA.

2.3. Apoptosis

Apoptosis atau kematian sel terprogram adalah suatu proses dengan karakteristik morfologi yang khas termasuk *blebbing* membrane plasma, penyusutan sel, kondensasi dan fragmentasi kromatin (Vermeulen K, *et al*, 2005). Gupta S (2001a,b) apoptosis merupakan suatu bentuk fisiologi bunuh diri sel yang berperan dalam embriogenesis, metamorphosis, keseimbangan selular dan suatu mekanisme pertahanan untuk menghilangkan sel terinfeksi, termutasi atau rusak. Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terprogram yang ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimuli fisiologi maupun patologi tanpa menimbulkan reaksi radang (Zeiss, CJ, 2003). Apoptosis merupakan sebuah pelestarian evolusioner dan bunuh diri sel yang diatur secara genetic yang berperan penting dalam perkembangan dan pemeliharaan homeostasis jaringan pada

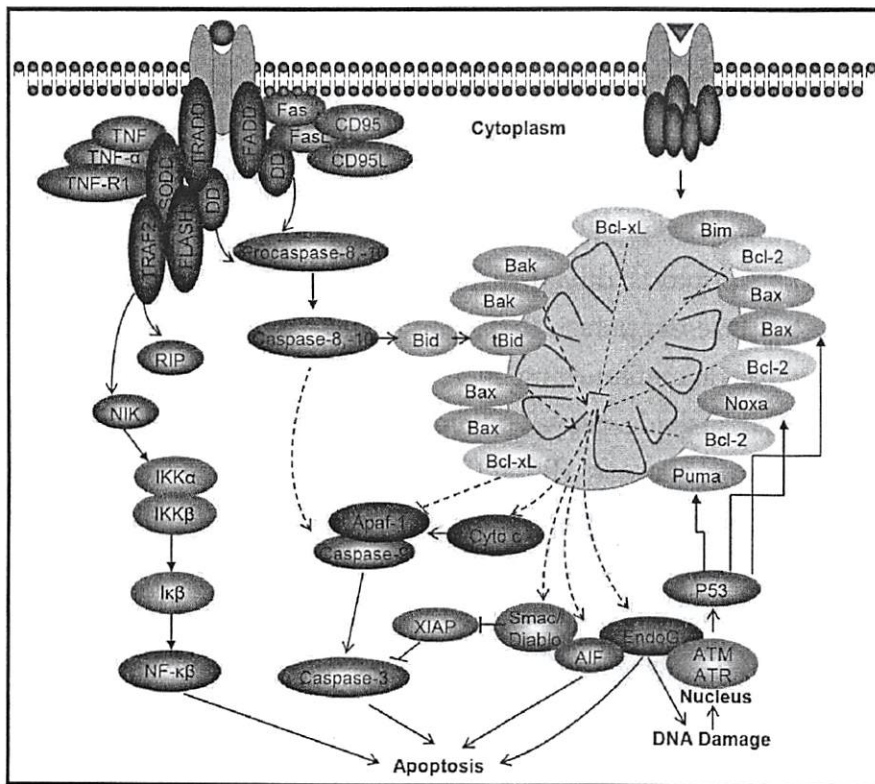
organisme multi selular (Shivapurkar N, *et al*, 2003). Pada peristiwa apoptosis sitoplasma sel tidak keluar sehingga berbagai respons radang tidak terjadi (Chang HY, Yang X, 2000).

Apoptosis ditandai oleh hilangnya hubungan selular dengan matriks, kontraksi sitoplasma, kondensasi kromatin, *blebbing membrane* plasma dan fragmentasi DNA menjadi oligosome yang besar dan kecil. Kematian sel yang alami berperan penting dalam banyak proses normal seperti perkembangan janin dan homeostasis jaringan. Regulasi apoptosis berkontribusi terhadap banyak penyakit termasuk kanker. Apoptosis memiliki peran dalam proses fisiologis auto destruksi seluler yang penting bagi perkembangan, pemeliharaan homeostasis dan pertahanan hospes organisme multi selular (Daniel NN, Krosmeier SJ, 2004). Apoptosis merupakan bagian dari perkembangan fisiologi tubuh normal selama masa perkembangan serta sebagai mekanisme homeostasis jaringan dan mekanisme pertahanan tubuh.

Apoptosis atau kematian sel yang terprogram melibatkan aktivasi suatu mesin intraseluler yang membutuhkan energi, yang di regulasi secara ketat dan dikonservasi selama evolusi. Apoptosis mempengaruhi sel tunggal secara asinkron, biasanya tanpa adanya perubahan inflamasi. Hal tersebut terlibat dalam morfogenesis jaringan embrio serta dalam homeostasis organ dan jaringan dewasa (Vermeulen K, *et al*, 2005). Sel apoptotik pertama kali diidentifikasi oleh serangkaian perubahan morfologi yang khas, dan morfologi masih menjadi bukti eksperimental penting dari proses yang mendasari. Awalnya, integritas membran sel dipertahankan sementara terjadi perubahan yang hampir tidak terlihat, misalnya paparan *phosphatidylserine*. Karakteristik sel apoptosis lainnya termasuk pengerutan selular, *blebbing* membran, kondensasi dan fragmentasi inti kromatin. Pada akhirnya, sel terpecah menjadi fragmen yang dikelilingi membran (*apoptotic*

bodies) yang dimakan secara *in vivo* oleh fagosit profesional (makrofag dan sel dendritik). Dalam kultur sel, *apoptotic bodies* akan kehilangan integritas membran plasma pada akhir tahapan apoptosis, diikuti dengan disintegrasi sel yang lengkap, yang juga disebut nekrosis sekunder (Vermeulen K, *et al*, 2005).

Apoptosis dibagi menjadi 3 fase yaitu fase induksi, fase efektor, fase degradasi. Pada fase induksi tergantung pada sinyal penyebab kematian yang menstimulasi sinyal proapoptosis dan memulai kaskade. Sinyal penyebab kematian tersebut antara lain *reactive oxygen species* (ROS) (Deshpande SS, *et al*, 2000), ceramide, aktivasi berlebihan jalur Ca^{2+} , protein famili *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) seperti *Bcl-2 associated x protein* (Bax) dan *Bcl-2 associated death promoter* (Bad). Pada fase efektor, sel akan mengalami kematian karena kerja pusat pengatur yaitu mitokondria mengarah pada kematian sel. Fase terakhir yaitu fase degradasi melibatkan serangkaian peristiwa yang terjadi baik di sitoplasma maupun di dalam inti sel. Aktivasi caspase terjadi di dalam sitoplasma sedangkan pada inti sel terjadi kondensasi kromatin, selubung inti pecah dan terjadi fragmentasi DNA untuk selanjutnya menjadi apoptosis yang di fagositosis oleh sel sekelilingnya maupun oleh makrofag. Pada tingkat molekuler apoptosis dibagi menjadi 3 fase yaitu inisiasi, fase eksekusi dan fase terminasi. Pada fase inisiasi apoptosis distimulasi berbagai macam faktor seperti rendahnya konsentrasi faktor pertumbuhan, radiasi sinar gamma, obat-obatan kemoterapik dan sinyal dari *death receptor*. Fase eksekusi ditandai dengan penggelembungan membrane sel (*blebbing*), fragmentasi inti, kondensasi kromatin dan degradasi DNA. Pada fase terminal apoptosis akan difagositosis oleh sel-sel fagosit (Krueger A, *et al*, 2001).



Gambar 2.3.

Jalur Signaling Apoptosis. (→) aktivasi; (-) inhibisi (dimodifikasi oleh Vermeulen K, et al, 2005).

2.3.1. Jalur Apoptosis

Apoptosis terjadi melalui 2 jalur yang dipicu oleh berbagai macam faktor baik internal maupun eksternal (Gupta S, 2001b; Crighton D, Ryan KM, 2004). Apoptosis melalui faktor internal disebut jalur intrinsik atau jalur mitokondria (*mitochondrial pathway*), sedangkan melalui faktor eksternal disebut juga jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*) (Singhal S, et al, 2005; Vermeulen, K, et al, 2005).

Salah satu ciri sel kanker adalah kemampuan kanker untuk menghindari apoptosis, ada dua jalur mendasar dalam apoptosis: jalur *death receptor* dan jalur *mitochondria*. Kedua jalur tersebut

sangat erat terhubung melalui caspase 8 dan Bid. Jalur pertama awali oleh aktivasi caspase yang diperantarai oleh reseptor permukaan sel, yaitu famili *cystein protease*. Terdapat dua kelompok caspase: caspase inisiator dan caspase efektor. Caspase inisiator (seperti 8, 9 dan 10) mengirimkan sinyal apoptosis dan mengaktivasi caspase efektor (seperti caspase 3, 6, dan 7) yang kemudian dapat mengaktivasi degradasi enzim yang menghancurkan sel (Singhal S, *et al*, 2005).

Terdapat bukti yang menyatakan bahwa kedua jalur tersebut dapat saling berhubungan pada tipe sel tertentu (Ashkenazi A, Dixit VM, 1998a,b; Gupta S, 2000a). Pada kedua jalur, suatu rangkaian langkah molekuler dan biokimiawi menyebabkan aktivasi efektor yang umum atau eksekusi sistein protease, *caspase* yang berakibat pada pemecahan sejumlah substrat inti atau sitoplasma, termasuk yang bertanggungjawab dalam mempertahankan integritas inti, perkembangan siklus sel, dan *repair* DNA. Terdapat beberapa inhibitor endogen apoptosis yang mencegah kematian sel yang spontan. Karena adanya peranan apoptosis dalam keseimbangan sel, maka kelainan pada apoptosis dapat berakibat pada akumulasi sel abnormal (yang menyebabkan kanker dan auto imunitas), atau hilangnya sel-sel (yang menyebabkan gangguan imuno defisiensi dan neurodegeneratif) (Gupta S, 2001c).

2.3.1.1. Jalur Mitokondria (*Mitochondria Pathway*)

Pada dekade terakhir, terdapat peningkatan pemahaman peranan mitokondria pada kematian sel (Green DR, Reed JC, 1998; Gupta S, 2001b; Kroemer G, Reed JC, 2000). Sejumlah stimulus, termasuk agen kemoterapu, radiasi UV, molekul stress (spesies oksigen reaktif dan nitrogen reaktif) tampak memperantarai apoptosis melalui jalur mitokondria, suatu jalur yang tidak

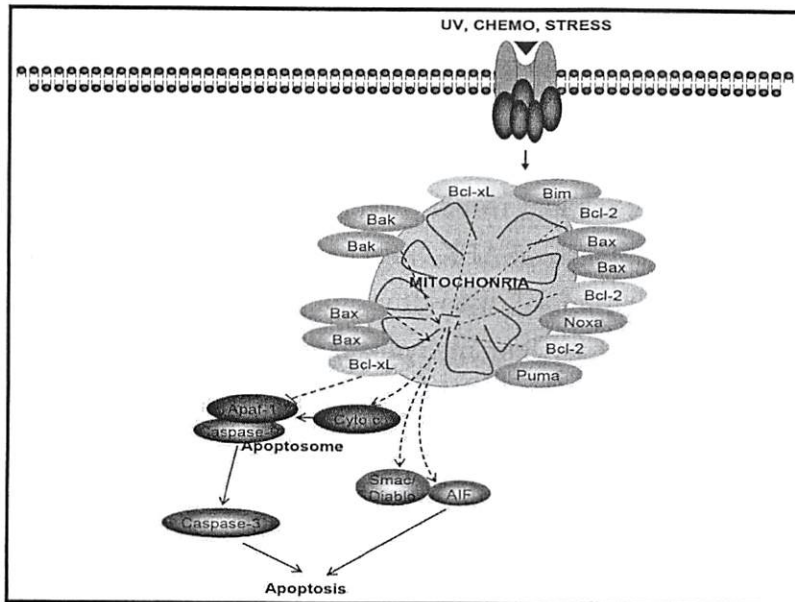
bergantung pada *death receptor*. Mitokondria adalah organel dengan dua kompartemen yang diketahui: matriks yang dikelilingi oleh membran dalam (*inner membrane* = IM), dan ruang intermembran yang dikelilingi oleh membran luar (*outer membrane* = OM). IM mengandung berbagai jenis molekul, termasuk ATP sintase, rantai transpor elektron, dan *adenine nucleotide translocator* (ANT). Dalam kondisi fisiologis, molekul tersebut menyebabkan rantai respirasi menghasilkan gradien elektrokimia (potensial membran). OM mengandung suatu kanal anion yang bergantung pada voltase. Bcl-2 terletak pada IM dan tampak berperan penting dalam mempertahankan potensial mitokondria. Ruang intermembran mengandung sitokrom c, pro-caspase tertentu, *adenylate kinase 2* dan *apoptosis-inducing faktor* (AIF). Oleh karena itu, permeabilisasi apoptosis pada OM berakibat pada pelepasan molekul-molekul tersebut. Permeabilisasi IM menyebabkan perubahan dalam potensial membran mitokondria. Pelepasan sitokrom c merupakan suatu langkah utama pada apoptosis jalur mitokondria yang dihubungkan dengan perubahan permeabilisasi membran mitokondria (*mitochondrial membrane permeabilization* = MMP). Permeabilisasi OM dan/atau IM mitokondria dikontrol oleh sejumlah anggota famili Bcl-2 (Adams JM, Corey SL, 1998; Gupta S, 2001a). Beberapa anggota pro-apoptosis famili Bcl-2, termasuk Bax, Bak, Bad, Bid, dan Bim memulai MMP dengan membentuk suatu kanal. Agar dapat mempengaruhi efek yang terjadi, anggota pro-apoptosis famili Bcl-2 harus mengalami translokasi dari sitosol ke dok pada OM mitokondria. Saat apoptosis, Bax yang berbentuk monomer, mengalami translokasi dari sitosol ke membran mitokondria untuk membentuk suatu *dimer* atau *oligomer* dengan tingkat yang lebih besar. Bak juga dapat berhubungan dengan OM. Bim, yang terdapat pada mikrotubulus, juga mengalami translokasi ke OM saat apoptosis. Bad, dalam bentuk fosforilasi (bentuk inaktif), mengalami

sekuestrasi (pengasingan) dalam sitoplasma melalui interaksi dengan protein 14-3-3. Saat apoptosis, Bad mengalami defosforilasi dan melakukan translokasi ke OM mitokondria dimana dia berinteraksi dengan anti-apoptosis Bcl-2 dan/atau Bcl-x_L dan mencetuskan MMP yang tampaknya penting dalam mencetuskan apoptosis. Bid merupakan protein lain yang terdapat dalam sitosol yang dipecah oleh caspase 8 dan melakukan translokasi ke OM, sehingga menyebabkan MMP dan pelepasan sitokrom c. Caspase-8 diaktivasi melalui jalur *death receptor*; oleh karena itu, Bid memberikan suatu mekanisme dimana jalur *death receptor* (CD95 dan TNFR) dihubungkan dengan jalur mitokondria. Namun, hubungan kedua jalur tersebut terjadi pada beberapa tipe sel. Dengan melakukan percobaan *knock out* dan transfeksi telah ditunjukkan bahwa Bcl-2 dan Bcl-x_L menghambat pelepasan sitokrom C. Fosforilasi anggota famili Bcl-2 membuat mereka menjadi inaktif. Sebagai respon terhadap agen genotoksik, *stress-activated protein kinase* (SAPK, juga disebut *c-jun amino-terminal kinase* atau JNK) melakukan translokasi ke mitokondria dan memfosforilasi Bcl-x_L, yang menyebabkan inaktivasi Bcl-x_L.

Pelepasan sitokrom c mencetuskan pertemuan Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) dan pro-caspase 9 untuk membentuk suatu apoptosome. ATP dibutuhkan untuk rekrutmen procaspase 9 oleh Apaf-1 melalui apa yang disebut CARD (*caspase recruiting domain*). Kemudian procaspase-9 secara autolitik dipecah menjadi caspase 9 aktif, yang kemudian mengaktivasi pro-caspase 3 menjadi caspase aktif yang menghasilkan pemecahan substrat dan apoptosis. Beberapa protein tertentu dalam ruang intermembran dapat mencetuskan apoptosis melalui jalur yang tidak bergantung pada caspase. Misalkan pada AIF, begitu dilepaskan dari mitokondria akan

ditransportasi ke nukleus, dimana dia mencetuskan fragmentasi DNA yang besar (ATP-independen) dan kondensasi kromatin.

Hubungan molekuler antara *death receptor* dan jalur apoptosis mitokondria dapat ditemukan pada tingkat pemecahan *caspase-8* Bid sitosol, yaitu suatu anggota sub-kelompok BH3-domain saja dari famili Bcl-2 (Li H, *et al*, 1998). Bid yang dipecah [*truncated Bid* (tBid)] mengalami translokasi dari sitosol ke mitokondria dan mengaktifkan jalur apoptosis yang bergantung pada mitokondria (Desagher S, *et al*, 1999; Zamzami N, *et al*, 2000). *Caspase-3* juga dapat memecah Bid, sehingga menimbulkan pelepasan sitokrom c dan apoptosis (Luo X, *et al*, 1998).



Gambar 2.4.

Mekanisme Molekuler Mitokondria (Intrinsik) Pada Apoptosis (dimodifikasi dari Gupta S, 2001b).

2.3.1.2. Jalur Reseptor Kematian (*Death Receptor Pathway*)

Death receptor merupakan gen super famili *tumor necrosis faktor receptor* (TNFR) yang ditandai oleh suatu daerah ekstra seluler yang kaya akan sistein. *Death receptor* memiliki suatu

rangkaian sitoplasma yang homolog, yaitu *death domain* (DD). Ligan untuk reseptor tersebut termasuk dalam gen famili *tumor necrosis faktor*. Secara umum, dapat dikatakan bahwa DD memperbolehkan *death receptor* untuk memberikan isyarat suatu rangkaian peristiwa yang menyebabkan apoptosis; namun, dalam beberapa hal mereka memperantari fungsi anti-apoptosis. Selanjutnya, meskipun beberapa anggota super famili *death receptor* kekurangan DD, mereka dapat memperantari suatu sinyal apoptosis (lihat apoptosis yang disebabkan oleh TNFR). Diantara *death receptor* yang dikenali dengan sangat baik yaitu CD95 (Fas) dan TNFR (Gupta S, 2001c). Kedua jalur tersebut akan dijelaskan sebagai berikut.

2.3.1.2.1. Jalur Kematian CD95/CD95L

Jalur CD95 berperan penting dalam perkembangan dan pemberlakuan fungsi sistem imun (Gupta S, 2000^{a,b,c}, Ashkenazi A, 1998). Fungsi tersebut tercapai melalui: [1] seleksi *repertoire* (perkumpulan) dan *deletion* (pengurangan) sel T dari sel T *self-reactive* dalam timus; [2] *deletion* perifer limfosit yang teraktivasi pada akhir respon imun; [3] mematikan sel target (misalkan sel yang terinfeksi virus, sel tumor) yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan *natural killer cell*; dan [4] mematikan sel inflamasi/imun pada lokasi '*immune privilege*' ('yang mempunyai hak imunitas khusus') seperti pada mata dan testes. Peranan jalur Fas/FasL dalam sistem imun didukung oleh pembentukan auto imunitas pada tikus dan manusia (sindrom limfoproliferatif autoimun) dengan mutasi pada gen *fas* atau *fasL* (Leonardo M, *et al*, 1999).

Ligan CD95 (CD95L, ligan fas) merupakan suatu protein membran homotrimetrik tipe II dengan berat 40kDa yang terikat pada CD95. Berbeda dengan CD95, yang diekspresikan secara

konstitutif pada banyak tipe sel, ekspresi CD95L terbatas. CD95L kurang pada sel T yang istirahat, namun distimulasi pada sel T yang teraktivasi. Ligasi CD95 dengan CD95L yang dapat larut atau sel yang berhubungan dengan CD95L menyebabkan berkumpulnya DD dari CD95, mengakibatkan suatu rantai kejadian dengan apoptosis sebagai puncaknya. Agregasi DD dari CD95 menyebabkan pengumpulan molekul adapter sitoplasmik yang juga mengandung DD, yaitu *Fas-associated death domain* (FADD). FADD juga mengandung suatu *death effector domain* (DED) yang terikat pada suatu domain analog dalam *procaspase 8* (juga disebut FLICE) yang terdapat pada sitoplasma dalam bentuk *zymogen* atau prekursor. Pertemuan dari DD CD95, FADD, dan *procaspase 8* membentuk suatu *death-inducing signaling complex* (DISC), yang berperan sebagai dasar jalur *signaling* berikutnya pada apoptosis. *Procaspase 8* secara autolitik terpecah menjadi *caspase 8* yang aktif. Baru-baru ini, terdapat suatu pernyataan bahwa molekul lain, yang disebut FLASH (*FLICE-Associated Huge protein*), dibutuhkan untuk aktivasi *procaspase 8* menjadi *caspase 8*. Namun, peranan protein tersebut dalam aktivasi *caspase 8* masih diperdebatkan. *Caspase 8* yang teraktivasi berperan sebagai suatu enzim untuk *downstream effector caspase* (*caspase 3, 6, dan 7*) yang juga terdapat dalam bentuk prekursor *zymogen*. *Caspase 8* yang aktif terpecah dan mengaktivasi efektor *caspase*. Efektor *caspase* aktif, kemudian memecahkan sejumlah substrat sitoplasmik dan inti, termasuk *poly ADP-ribose polymerase* (PARP, yang bertanggung-jawab dalam repair DNA), DNA-PK (bertanggung-jawab dalam siklus sel), Lamin B (membran inti), PKC θ , dan ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*). Pecahan ICAD menjadi CAD menyebabkan migrasi CAD ke inti kemudian memecah DNA kromosomal.

2.3.1.2.2. Jalur Kematian TNFR

TNF merupakan suatu sitokin pleiotropik yang terutama dihasilkan oleh makrofag dan sel T. TNF menstimulasi proliferasi, mendesak aktivitas sitolitik atau sitostatik terhadap sel tumor, menyebabkan respon inflamasi dan antivirus, dan meregulasi respon imun. TNF memperantarai efek biologisnya melalui TNFR-I dan TNFR-II. Kedua TNFR memiliki homologi yang signifikan pada domain ekstraselulernya; namun, berbeda pada domain sitoplasmanya. TNFR-I mengandung DD, sementara TNFR-II hanya memperantarai sinyal stimulatori (Ashkenazi A, 1998). Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa kedua reseptor dapat memperantarai apoptosis.

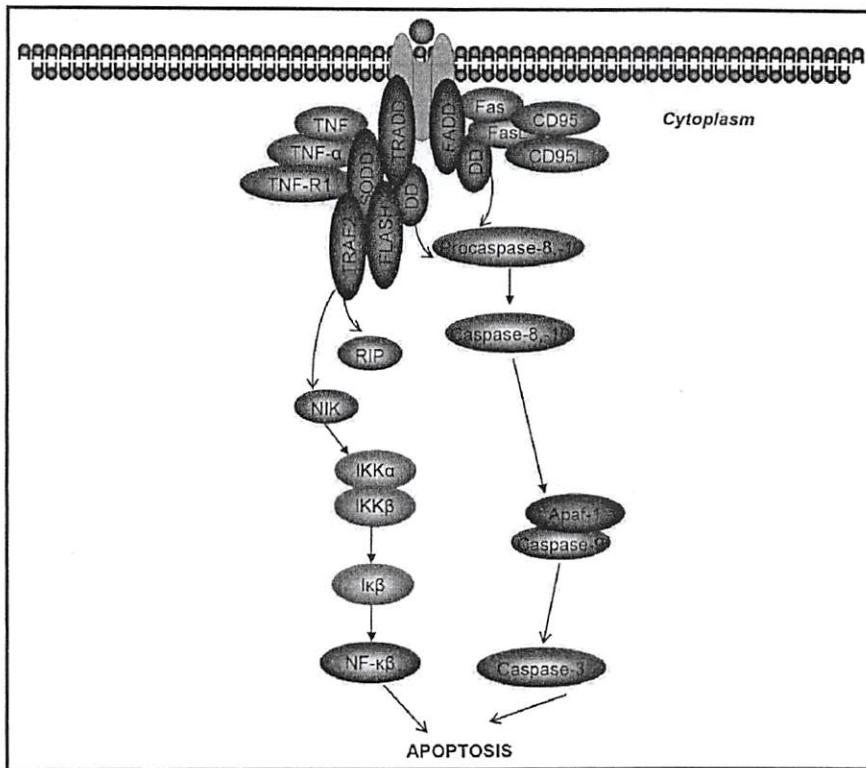
TNFR tidak menghambat aktivitas enzimatis, dan oleh karena itu bergantung pada rekrutmen molekul lain untuk *signaling*. Ligasi selanjutnya dengan TNF, TNFR-I mengalami trimerisasi dan asosiasi pada DD dan rekrutmen yang berikutnya pada protein yang sesuai, yaitu TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*). TRADD berperan sebagai suatu landasan untuk merekrut beberapa molekul lainnya yang sesuai, yaitu FADD, TRAF-2 (*TNFR-Associated Faktor 2*), dan RIP (*Receptor Interactive Protein*). RIP menstimulasi suatu jalur yang menyebabkan aktivasi NF- κ B, sementara FADD memperantarai aktivasi jalur apoptosis (serupa dengan yang diamati pada apoptosis yang diperantarai CD95) melalui rekrutmen dan aktivasi caspase regulasi dan efektor. TRAF-2 dan RIP mengaktifasi *NF- κ B-inducing kinase* (NIK), yang mengaktifasi inhibitor dari *I- κ B kinase* (IKK); IKK memfosforilasi I- κ B, yang berakibat pada degradasi dan pelepasan NF- κ B, kemudian mentranslokasi nukleus dan mengaktifasi sejumlah gen. IKK β lebih poten dibandingkan IKK α dalam aktivasi NF- κ B. Penelitian terbaru menyatakan bahwa, meskipun RIP dibutuhkan untuk induksi yang diperantarai TNFR-I baik

pada apoptosis dan aktivasi NF- κ B pada sel T, kerjanya pada TNFR-1 *downstream* bergantung pada tipe sel (Gupta S, 2001b). Pada fibroblast tikus, RIP dibutuhkan untuk aktivasi NF- κ B dan bukan untuk kematian sel.

Pada sel T manusia, RIP dibutuhkan untuk kematian sel yang disebabkan oleh TNFR-II namun tidak untuk aktivasi NF- κ B. Pada sel T yang istirahat atau sel T teraktivasi yang belum terpapar interleukin 2 (IL-2), TNF mengaktivasi NF- κ B melalui TNFR-II dan suatu jalur yang bergantung pada TRAF-2. Pada sel T teraktivasi yang telah terpapar IL-2, RIP distimulasi dan dipercaya sebagai penghubung kompleks TNFR-II-TRAF-2 dengan FADD. Jalur *signaling downstream* berikutnya menyebabkan apoptosis sama dengan TNFR-I dan CD95.

Protein NF- κ B tampak menunjukkan baik stimulasi ataupun pencegahan apoptosis. Beg AA, Baltimore D (1996) menunjukkan bahwa fibroblast dan makrofag dari tikus yang kekurangan NF- κ B rentan terhadap apoptosis yang dicetuskan oleh TNF, sementara tikus normal resisten terhadap apoptosis. Van Antwerp DJ, *et al* (1996) menunjukkan bahwa dengan mengenalkan suatu bentuk mutan I κ B (untuk mempertahankan agar NF- κ B terasing dalam sitoplasma), sel dibuat sensitif terhadap apoptosis oleh agen yang mengaktivasi NF- κ B (misalkan TNF, radiasi ionisasi, daunorubicin). Kedua penelitian tersebut menciptakan peran NF- κ B sebagai suatu '*repressor*' (penekan) apoptosis. Sebaliknya, NF- κ B tampak sebagai pro-apoptosis. Dalam *activation-induced apoptosis* (apoptosis yang dicetuskan oleh aktivasi), NF- κ B berperan penting dalam up-regulasi CD95L dan oleh karena itu juga berperan penting dalam apoptosis yang diperantarai oleh CD95/CD95L. Disamping CD95L, gen p53 dan cMyc adalah target NF- κ B; kedua gen tersebut merupakan pro-apoptosis. Grimm S, *et al* (1996) menunjukkan bahwa NF- κ B

terutama diaktivasi saat apoptosis disebabkan oleh *withdrawal* serum, dan bahwa aktivasi NF- κ B penting untuk induksi apoptosis (Gupta S, 2001a,b,c).



Gambar 2.5.

Mekanisme Molekuler Reseptor Kematian (Ekstrinsik) Pada Apoptosis, Dimediasi TNF- α dan CD95 (dimodifikasi dari Gupta S, 2001c).

DAFTAR PUSTAKA

- Adams JM, Corey SL. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1998a; 11: 255-260.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 1998b; 281: 1305-1308.
- Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19: 238-245.
- Beg AA, Baltimore D. An Essential Role for NF- κ B in Preventing TNF- α -Induced Cell Death. *Science* 1996; 274: 782-784.
- Berridge MJ, 2009. Cell signaling biology in cell cycle and proliferation. Portland Press Limited, Page 1-39.
- Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumor genesis. *Nat Rev Cancer* 2004a; 4: 793-805.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 297-308.
- Chang HY, Yang X. proteases for cell suicide: functions and regulation of caspase. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 821-846.
- Crichton D, Ryan KM. Splicing DNA-damage responses to tumor cell death. *Biochimica et Biophysical Acta* 2004; 1705: 3-15.
- Daniel NN, Krosmeier SJ. Cell death: critical control point. *Cell* 2004; 116: 205-219.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Laupher S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou J. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial

- Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by Reactive Oxygen Species. *The FASEB Journal* 2000; 14: 1705-1714.
- Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcription network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005; 24: 2810-2826.
- Enders GH. Expanded roles for Chk1 in genome maintenance. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 17749-17752.
- Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; 25: 5220-5227.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- Grimm S, Bauer M, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 attenuates the activity of NF- κ B which is induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* 1996; 134, 13-23.
- Gupta S. Molecular and biochemical pathways of apoptosis in lymphocytes and aged humans. *Vaccine* 2000a; 18: 1596-1601.
- Gupta S. Molecular steps of apoptosis. *Life Sciences* 2001a; 69: 2957-2964.
- Gupta S. Molecular steps of cell suicide: An insight into immune senescence. *J. Clin. Immunol.* 2000b; 20: 229-239.
- Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sciences* 2001c; 69: 2957-2964.
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-582.
- Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005; 24: 2776-2786.

- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzal M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ & Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; 18: 283-293.
- Kumar V., Robbins, Leonard S. 2010. Neoplasia in: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. p. 269-342.
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Med.* 2000; 6: 513-519.
- Krueger A, Bauman S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory protein: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol. Chem.* 2001; 21 (24): 8247-8254.
- Leonardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 221-253.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490.
- Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E. AMPK and cell proliferation-AMPK as therapeutic target for cancer and atherosclerosis. *J Physiol* 2006; 574(1): 63-71.
- Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005; 24, 2787-2795.
- Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer (review). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(4Pt1): 1355-67.

- Shivapurkar N, Reddy I, Chaudhary PM, Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: a review. *J. of Cell. Biochem.* 2003; 88; 885-898.
- Singhal S, Vachani A, Ozerkis DA, Kaiser LR, Albelda SM. Prognosis implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis biomarker in non-small cell lung cancer: a review. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(11): 3974-3986.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996; 274: 787-789.
- Vermeulen K, Bockstaele Van DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanism and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 2005; 84: 627-639.
- Watuguly T, Yotopranoto S, Subekti S. Uji toksisitas Bioinsektisida ekstrak biji mahkota dewa (*Phaleria papuana* Warb.) terhadap mortalitas stadium larva *Aedes aegypti* Linn. di laboratorium. *Maj Ked Trop Indo* 2005; 17(1): 33-46.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-30.
- Zamzami N, El Hamel C, Maisse C, Brenner C, Munoz-Pinedo C, Belzacq AS, Costantini P, Vieira H, Loffler M, Molle G, Kroemer G. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 6342-6350.
- Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis Continuum: Insight from generically altered mice. *Vet. Pathol.* 2003; 40: 481-495.

BAB III

PERAN PROTEIN APOPTOSIS

Standar Kompetensi

Sesudah mempelajari Bab ini, mahasiswa diharapkan dapat:

1. Menjelaskan peran protein yang berperan pada jalur apoptosis
2. Menjelaskan peran protein 53 pada jalur apoptosis
3. Menggambarkan secara skematis jalur p53 dan siklus sel
4. Menjelaskan peran protein bcl-2, protein BAX dan peran caspase
5. Memberikan contoh anggota sub-famili dari famili caspase (*cystein-dependent aspartat-directed protease*)



3.1. Peran Protein Apoptosis

3.1.1. Peran P53

Gen *suppressor* tumor p53 merupakan gen yang paling sering bermutasi pada kanker (Rom WN, *et al*, 2000) dan mengalami mutasi pada 50% (NSCLC) sampai 70% (SCLC) dari kanker paru. Mutasi pada p53 umumnya mencerminkan paparan terhadap karsinogen lingkungan. Protein p53 secara tepat disebut sebagai "pelindung dari genom" (*guardian of the genome*) karena gen p53 diinduksi oleh agen perusak DNA dan kemudian baik memperlambat perkembangan siklus sel, atau mengarahkan sel

yang rusak cepat ke kematian sel yang terprogram (Greenblatt MS, *et al*, 1994). Protein p53 merupakan suatu faktor transkripsi inti (*nuclear transcription faktor*) yang mengikat promotor p21 sehingga mendorong ekspresinya dan menghambat perkembangan siklus sel pada *checkpoint* siklus sel G₁/S (Rom WN, *et al*, 2000). P53 mutan tidak dapat mengaktivasi p21, dan siklus sel berlangsung surut, sehingga disebut dengan istilah "*suppressor tumor*", atau p53 dapat menginduksi Bax, yaitu suatu gen yang meningkatkan apoptosis (Prives C, 1998). Kebanyakan mutasi *missense* pada gen p53 terjadi pada domain pengikatan DNA yang akibatnya menonaktifasi fungsi dari transaktivasinya. Mutasi p53 sangat meningkatkan paruh waktu protein, yang seringkali memungkinkan pendeteksian imunohistokimia p53 mutan, misalnya, pada epitel bronkial yang sangat displastik atau pada jaringan tumor. Untuk gen *suppressor tumor*, ekspresi fenotipik memerlukan kedua alel hilang melalui mutasi, delesi besar, atau mekanisme rekombinan lainnya. Pada kanker paru, barisan sel Calu-1 (kedua alel p53 akan dihapus) dan A549 (yang mengandung p53 tipe *wild*), terhentinya pertumbuhan (*growth arrest*) dapat diinduksi setelah diberi perlakuan secara *in vitro* dengan *phorbol ester*, yang mengaktivasi suatu *cascade signaling* protein kinase C. Induksi ekspresi p21 oleh *phorbol ester* bertepatan dengan terhentinya pertumbuhan pada G₂/M.

P53 terletak pada kromosom 17p dan terdiri dari 393 asam amino. Domain transaktivasinya berada pada N-terminus yang diikuti dengan rangkaian domain pengikatan DNA spesifik dan domain oligomerisasi pada C-terminus. Mutasi p53 pada kanker paru dikelompokkan di tengah-tengah gen pada kodon 157, 245, 248, dan 273. Signifikansi nyata lokasi mutasi tersebut menjadi jelas ketika karsinogen asap tembakau, yaitu Benzo (a) Pyrene, ditunjukkan dapat menginduksi BPDE *adduct* pada lokasi CpG di

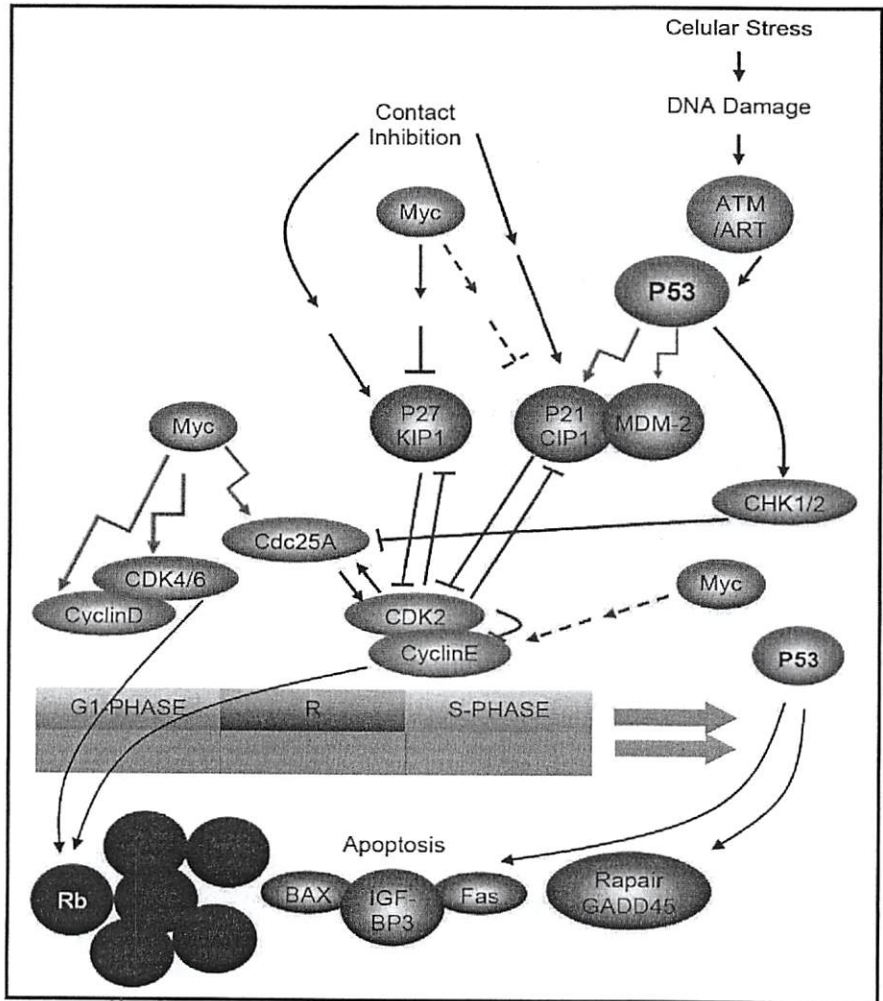
kodon 157, 248, dan 273 *in vitro* pada sel epitel bronchial (Denissenko MF, *et al*, 1996). Kodon tersebut mengandung CpG island, dan keberadaan 5-methyl cytosine sangat meningkatkan pengikatan BPDE pada *guanine*. Mutasi p53 yang terlihat pada kanker paru merupakan transverse dari *guanine* menjadi *thymine* yang terjadi pada lokasi CpG dimana BPDE-DNA adduct terbentuk *in vitro*. Menariknya, mutasi tersebut terjadi pada untai DNA yang non-transkripsi, yang diperbaiki secara relatif tidak efisien. Mutasi kodon 157 tampak unik pada kanker paru, sedangkan mutasi kodon 248 dan 273 terjadi pada *hot spot* kanker lainnya, misalnya pada usus, hati, dan prostat. Orang bukan perokok yang mengalami kanker paru memiliki pengelompokan acak mutasi p53 yang hampir seluruhnya berbeda (Denissenko MF, *et al*, 1997).

TSG p53 terletak pada lengan pendek kromosom 17 (17p13) dan mengkode untuk suatu fosfoprotein 53-kDa. Dalam fisiologi normal protein tersebut mencegah akumulasi kerusakan genetik pada sel anak (*daughter cell*) dan karena itu disebut "pengawal genom" (*the guardian of the genome*). Dalam menanggapi stres selular, p53 bertindak sebagai faktor transkripsi yang menginduksi ekspresi gen *downstream* seperti *cyclin-dependent kinase* (CDK) *inhibitor* p21^{KIP}, GADD45 atau BAX. Gen target *downstream* p53 meregulasi sinyal *checkpoint* siklus sel yang menyebabkan sel mengalami *G1 arrest*, sehingga memungkinkan perbaikan DNA, atau apoptosis. Onkogen MDM2, yang juga merupakan target gen p53, berfungsi sebagai sistem umpan balik negatif, menginaktivasi protein p53 (gambar 2.7) (Zhang Y, *et al*, 1998). Mutasi yang mengalami inaktivasi dalam TSG p53 termasuk dalam perubahan yang paling umum pada kanker, termasuk kanker paru. Mutasi p53 seringkali berupa substitusi basa tunggal (*single-base*), yang terjadi pada kebanyakan kasus

pada ekson 5-8 (Holstein M, *et al*, 1991). Serupa dengan mutasi K-RAS, kebanyakan mutasi merupakan transversasi G-T dan terdapat korelasi positif antara mutasi dengan penggunaan tembakau.

Mutasi dalam gen p53 *suppressor* tumor adalah salah satu perubahan genetic paling umum yang muncul di dalam kanker paru, sekitar 70% dari SCLC dan 50% dari semua NSCLC mengalami mutasi dalam satu alel p53 yang sering disertai dengan kehilangan *wild-type allele* (Victorsson K, *et al*, 2005; Brambilla C, *et al*, 2003). Protein 53 memainkan peran yang sangat penting dalam mendeteksi kerusakan DNA dan memberi frekuensi mutasi p53 yang tinggi dalam kanker paru yang mungkin memperburuk beberapa fungsi p53, peran p53 sudah ditunjukkan sebagai penanda prediksi bagi respon perlakuan.

Sebagai respon terhadap stres selular, protein 53 yang diinduksi. P53 yang diaktivasi bertindak sebagai faktor transkripsi bagi gen-gen lain yang terlibat dalam kontrol siklus sel (p21, MDM-2), repair DNA (GADD45) dan kontrol apoptosis (Bax, IGF-BP). Jika siklus sel berhasil melewati *checkpoint* G1/S, maka p53 dapat menghentikan siklus sel dan memungkinkan perbaikan. Jika siklus sel sudah melewati *checkpoint* G1/S atau kerusakan tidak dapat diperbaiki, maka p53 dapat menginduksi apoptosis. MDM-2, target p53, berfungsi sebagai umpan balik negatif (gambar 3.1).



Gambar 3.1.

Gambaran skematis jalur p53 dan siklus sel (dimodifikasi dari Breuer RHJ, et al, 2005).

Protein p53 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1979 sebagai *transformation related* protein dan protein yang terakumulasi pada inti sel kanker serta berikatan kuat dengan antigen T simian virus 40 (SV40). Akan tetapi, sepuluh tahun kemudian, para peneliti mendapatkan bahwa ternyata protein tersebut merupakan mutasi dari bentuk awal p53/wild-type p53

(wt p53) dan sifat on-kogenik p53 sebenarnya merupakan hasil dari mutasi p53 (Bai L & Zhu G, 2006). Gen p53 merupakan *tumor suppressor gene* yang multifungsi dan sering mengalami alterasi pada kanker ovarium dan jenis kanker lainnya. Pada kondisi normal, p53 berinteraksi dengan berbagai jenis protein yang terlibat dalam regulasi transkripsional, repair DNA, siklus sel, apoptosis, dan degradasi protein yang dimediasi oleh proteosom (Havrilesky L, *et al.*, 2003).

Produk protein dari gen ini. p53, merupakan salah satu molekul terpenting dalam dunia biologi. Berbagai peran dari p53 yang berhubungan dengan kanker terus berusaha diteliti, sejauh ini fungsi yang telah diketahui mencakup pengaturan siklus sel, penuaan sel, kematian sel atau apoptosis, perbaikan kerusakan DNA yang disebabkan oleh agen 26 genotoksik, angiogenesis dan regulasi stress oksidatif. Dengan relevansi fungsi yang sangat luas menempatkan p53 pada posisi pengendali yang bertanggung jawab terhadap berbagai proses terkait dengan kanker. Begitu pula mengingat banyaknya mitra interaksi, tidaklah mengherankan jika penyimpangan pada p53 sangat sering ditemukan pada kanker (Foulkes WD, 2007).

Dalam kondisi normal, jaringan p53 dalam kondisi tidak aktif, biasanya diaktifkan oleh semacam stress seluler yang dapat mengubah siklus pertumbuhan sel normal atau menginduksi mutasi genom yang kemudian mengarah pada transformasi onkogenik. Protein p53 aktif dapat menghentikan siklus sel atau, pada banyak kasus. Menghidupkan jalur apoptosis dan memaksa sel-sel rusak dan mengandung mutasi melakukan bunuh diri sehingga mencegah perbanyakan dan pertumbuhan selular yang abnormal. Oleh karena itu, protein p53, sebagai guardian of genom, adalah inhibitor penting dari perkembangan tumor sehingga menjelaskan mengapa gen ini menjadi paling sering

bermutasi dalam penyakit kanker pada manusia (Bourdon JC, *et al*, 2003). Tumor *suppressor* gen p53 ditemukan bermutasi pada lebih dari 50% kanker pada manusia. Kapasitas dari p53 dalam beberapa fungsi biologis dapat dikaitkan dengan kemampuannya bertindak sebagai suatu faktor transkripsi untai-spesifik untuk mengatur ekspresi lebih dari 100 gen target yang berbeda, demikian juga untuk mengatur berbagai proses seluler termasuk apoptosis, penghentian siklus sel dan perbaikan DNA. Protein p53 dengan struktur C-dan N-terminal yang unik dimodulasi oleh beberapa proses biologis penting seperti fosforilasi, asetilasi, sumolasi dan ubiquitinasi, melalui proses tersebut secara efektif mampu mengatur pertumbuhan dan kematian sel (Anderson CW& Appela W, 2002).

3.1.2. Peran Protein Bcl-2, Protein BAX dan Peran Caspase (Cystein-Dependent Aspartat-Directed Protease)

3.1.2.1. Protein Bcl-2

Keluarga *protein B cell lymphoma-2* (Bcl-2) meliputi antiapoptosis dan proapoptosis. Gen Bcl-2, yang terletak pada kromosom 18, mengkode suatu protein 26-kDa yang menghalangi apoptosis. Saat kondisi normal protein Bcl-2 mempertahankan keseimbangan antara kematian dan kelangsungan hidup sel. Dalam sel dengan ekspresi Bcl-2 yang berlebihan, heterodimer Bcl-2-Bax mendominasi dan sel menjadi kurang rentan terhadap stimulus apoptosis (Breuer RHJ, *et al*, 2005).

Overekspresi Bcl-2 secara spesifik menghambat sel memulai apoptosis. Ekspresi Bcl-2 berkaitan dengan prognosis buruk pada kanker paru, prostat, kanker kolon dan neuroblastoma (Poleri C, *et al*, 2003). Schimmer AD, *et al* (2001) mengemukakan bahwa saat ini Bcl-2 merupakan target yang banyak digunakan dalam penemuan obat baru dimana Bcl-2 menunjukkan

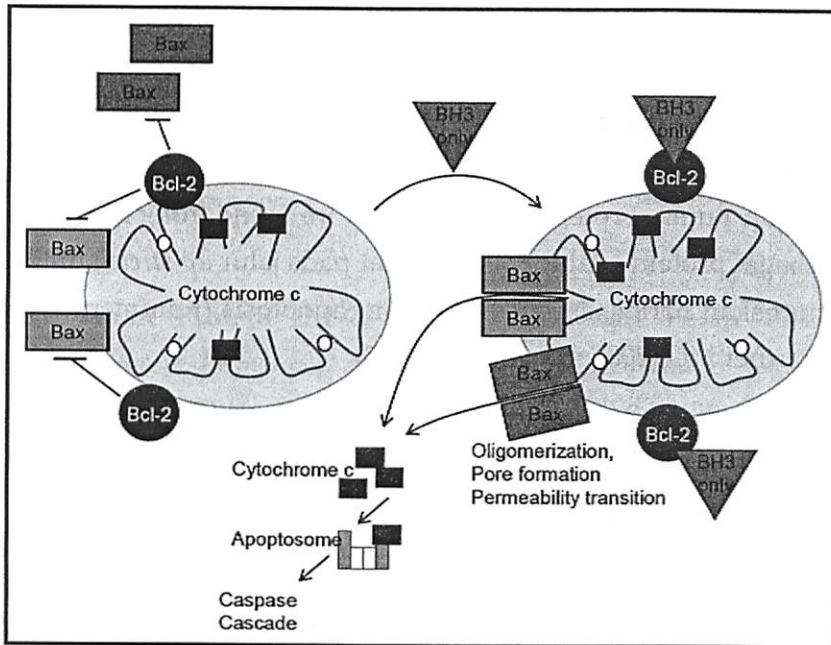
overekspresi pada berbagai keganasan dan sering dihubungkan dengan kegagalan terapi klinis.

Bcl-2 merupakan salah satu anggota famili protein Bcl-2 yang dapat dibedakan menjadi 3 subkelompok. Sub kelompok pertama bersifat antiapoptosis terdiri dari Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva dan Nrf3. Protein sub kelompok ini mencegah kematian sel dengan mengikat anggota famili Bcl-2 dari subkelompok yang lain. Subkelompok kedua bersifat proapoptosis terdiri dari Bax, Bak, dan Bok/Mtd. Aktivitas dari anggota subkelompok ini dapat menstimulasi pelepasan sitokrom c dari membran mitokondria. Subkelompok ketiga yang bersifat proapoptosis, terdiri dari Bid, bad, Bim, Bik/Nbk, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa dan Puma. Protein sub kelompok ini mendorong kematian sel sebagai protein adaptor yang terikat pada jalur *up-stream* untuk memutuskan berlangsungnya program apoptosis (Kaufmann SH, Hengartner MO, 2001; Hsu S, *et al*, 2003).

Famili Bcl-2 memiliki faktor pro-apoptosis (Bax, Bak, Bcl-xs dan Bid) dan faktor anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w). Ketika sel-sel yang dipaparkan pada stimulasi apoptosis, protein pro-apoptosis diaktivasi melalui modifikasi post-translasi atau perubahan dalam konformasinya. Lokasi tindakan (*site of action*) yang penting tampaknya berupa mitokondria, dimana protein tersebut meningkatkan permeabilitas membran luar yang mengakibatkan pelepasan protein, termasuk sitokrom c, dari ruang antar membran. Dalam sitosol, sitokrom c mengaktifasi caspase yang pada akhirnya mengakibatkan apoptosis (Singhai S, *et al*, 2005).

Protein-protein Bcl-2 bertranslokasi ke membran mitokondria dan memodulasi apoptosis dengan menimbulkan permeabilitas membran-dalam dan membran-luar mitokondria sehingga berakibat lepasnya sitokrom c. Sebagian besar protein

famili Bcl-2 mampu berinteraksi secara fisik, membentuk homodimer/heterodimer, dan berfungsi mengatur apoptosis. Selain itu Bcl-xL mengikat dan menginaktivkan Apaf-1, sementara anggota-anggota yang proapoptosis dapat menggeser Bcl-xL dari ikatannya dengan Apaf-1 yang memungkinkan apaf-1 mengaktifasi caspase-9. Resistensi akibat kemoterapi diantaranya diakibatkan oleh peningkatan Bcl-2 dan Bcl-xL (gambar 3.2) (Herr I, Debatin KM, 2001).



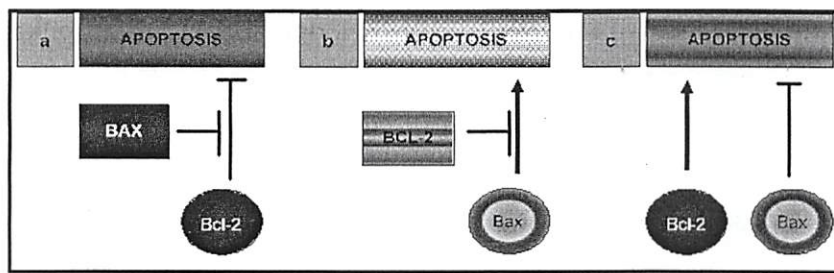
Gambar 3.2.

Gambaran Skematis Mengenai Peranan Bcl-2, BAX dan Survivin Dalam Apoptosis (dimodifikasi dari Herr I, Debatin KM, 2001).

Penjelasan: Stimulus apoptosis dapat melakukan *up*-regulasi ekspresi Bax sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara pro-apoptosis Bax mono- dan heterodimer versus anti-apoptosis Bcl-2 dimer, yang menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria, mengaktifasi *caspase* 9, yang mengaktifkan *caspase*

lainnya. Faktor anti-apoptosis survivin menghambat apoptosis dengan terikat pada *caspase* awal serta *caspase* efektor.

Proses regulasi apoptosis sangat bergantung pada rasio antara Bcl-2 dan Bax untuk menentukan apakah sel akan bereaksi dengan menjadi apoptosis atau tetap bertahan hidup. Ada tiga model untuk menggambarkan rasio prosurvival (Bcl-2) dan proapoptosis (Bax) dalam menghambat atau menyebabkan apoptosis. Model pertama menyebutkan Bcl-2 menghambat apoptosis dan Bax menghapus hambatan tersebut sehingga terjadi apoptosis. Model kedua menyebutkan bahwa Bax menginduksi apoptosis dan Bcl-2 menghambat induksi ini. Model ketiga yaitu model yang menyebutkan adanya saling ketergantungan. Bcl-2 menghambat apoptosis dan Bax menginduksinya. Namun demikian sesungguhnya apoptosis merupakan kombinasi ketiga model yang ada dan terjadi secara kompleks (Chao DT, Korsmeyer SJ, 1998) (gambar 3.3).

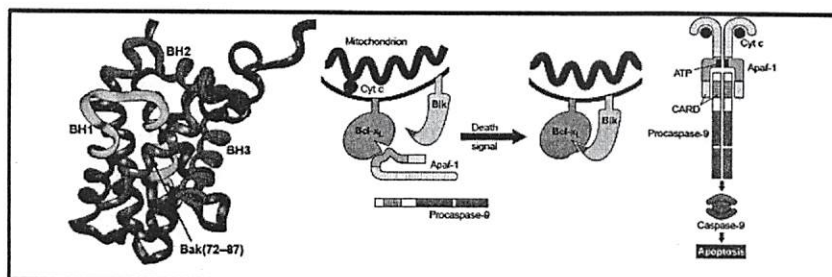


Gambar 3.3.

Model Rasio Bcl-2 dan Bax Dalam Menyebabkan Apoptosis (dimodifikasi dari Chao DT and Corsmeyer SJ, 1998).

Protein Bcl-2 mencegah lepasnya sitokrom c dari mitokondria dengan membentuk homodimer dan heterodimer dengan proapoptosis Bax. Ketidakseimbangan rasio Bax/Bcl-2 sehingga Bax berhasil membentuk homodimer akan menyebabkan lepasnya sitokrom c dari mitokondria. Selanjutnya sitokrom c

akan mengaktifkan Apaf-1. Untuk menjadi aktif Apaf-1 memerlukan dua ko-faktor yaitu ATP dan sitokrom c. Sitokrom c yang telah keluar dari ruang intermembran mitokondria masuk ke dalam sitoplasma, akan terikat dengan Apaf-1 yang selanjutnya akan menyebabkan kaskade caspase sampai terjadi apoptosis (gambar 3.4) (Adams JM, Cory S, 1998).



Gambar3.4.

Struktur Bcl-xL Dengan Sebuah BH3 Terikat Peptida dan Model Regulasi Untuk Apaf-1 Pada Keluarga Bcl-2 (dimodifikasi dari Adams JM, Cory S, 1998).

Penjelasan:(kiri). Struktur Bcl-xL dengan sebuah BH3 terikat peptida. Daerah BH1, BH2, dan BH3 dari Bcl-xL ditampilkan masing-masing warna kuning, merah, dan hijau. Bak BH3 peptida (16 asam amino) mengikat alur dalam oranye. (kanan) Model regulasi untuk Apaf-1 pada keluarga Bcl-2. Bcl-xL (atau anggota lain procaspase) dapat mengikat Apaf-1 dan mencegah mengaktifkan procaspase-9 (atau memulai procaspase lain). Mungkin sebuah sinyal kematian, misalnya, memicu interaksi anggota keluarga BH3 (di sini Bik) atau mungkin anggota keluarga Bax dengan Bcl-xL, mencegah dari menetralkan Apaf-1. Dengan adanya sitokrom c dilepaskan dari mitokondria dan ATP, Apaf-1 kemudian dapat mengikat procaspase-9 dan aktivasi autocatalisis. Caspase-9 selanjutnya mengaktifkan caspases efektor. CARD menunjukkan hubungan protein domain.

Penelitian-penelitian mengenai ekspresi Bcl-2 dan akhir kanker paru memberikan hasil yang saling bertentangan. Meskipun satu penelitian menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 yang tinggi memberikan prognosis yang buruk (Poleri C, *et al*, 2003), namun penelitian lain yang dilakukan menunjukkan bahwa Bcl-2 adalah suatu pertanda prognostik independen pada kelangsungan yang baik (Cox G, *et al*, 2001).

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 kecil mengenai penyakit stadium lanjut, ekspresi Bax dikaitkan dengan peningkatan kelangsungan hidup rata-rata pada stadium IV NSCLC (Gessner C, *et al*, 2002; Singhai S, *et al*, 2005).

Protein Bcl-2 diekspresikan pada sekitar 35% dari NSCLC dengan sedikit preferensi terhadap sub tipe SCC (Apolinario RM, *et al*, 1997). Ekspresi berlebihan protein Bcl-2 didapatkan pada PL (Brambilla E, *et al*, 1998). Menariknya, pewarnaan untuk Bcl-2 berhubungan dengan keparahan derajat histopatologi displasia. Penelitian Brambilla E, *et al* (1998) mendeteksi peningkatan ekspresi Bcl-2 pada lapisan sel suprabasal sedangkan pewarnaan sel pada lapisan sel basal mengalami pengurangan. Kedua penelitian juga menyelidiki pola ekspresi Bax pada PL dan NSCLC dan menunjukkan ketidakseimbangan antara pergeseran Bcl-2 dan Bax dalam mendukung kelangsungan hidup sel selama karsinogenesis. Martin B, *et al* (2003), melakukan penelitian meta-analisis menggunakan 3.370 pasien dengan menyelidiki nilai

prognostik ekspresi Bcl-2 pada NSCLC. Kesimpulan yang didapatkan yaitu bahwa tingginya ekspresi Bcl-2 berhubungan dengan yang kelangsungan hidup yang lebih baik. Menariknya, *down-regulation* Bcl-2 yang diperantarai antisense mengembalikan apoptosis pada sel-sel kanker (Took B, *et al*, 2003) dan oleh karena itu tampak sebagai suatu agen yang poten.

3.1.2.2. Protein BAX

Protein Bax, suatu homolog dari Bcl-2, menyebabkan apoptosis. Gen Bax terletak pada kromosom 19 dan protein ini dapat membentuk heterodimer dengan Bcl-2 atau Bax sendiri. Dalam kondisi normal protein Bax mempertahankan keseimbangan antara kematian dan kelangsungan hidup sel. Dalam sel dengan ekspresi Bax yang berlebihan, heterodimers Bax mendominasi dan sel-sel diarahkan ke apoptosis (Breuer RHJ, *et al*, 2005).

3.1.3. Peran Caspase (*Cystein-Dependent Aspartat-Directed Protease*)

Caspase, protease famili *interleukin-1 β -converting enzyme*, merupakan homolog *Caenorhabditis elegans* gen kematian sel CED-3. Empat belas caspase telah diidentifikasi sejauh ini, semuanya memiliki beberapa kesamaan sifat: mereka merupakan protease sistenin yang spesifik aspartat; mereka mempunyai suatu lokasi aktif pentapeptida konservatif 'QACXG' (X dapat berupa R, Q, atau D); pre-kursor mereka semuanya zymogen yang dikenal sebagai pro-caspase. N-terminal prodomain dalam procaspase mengandung struktur yang sangat beraneka ragam yang dibutuhkan untuk aktivasi caspase; dan mereka semuanya mampu melakukan auto aktivasi serta aktivasi sub-unit lain,

untuk menghasilkan heterodimer dengan sub-unit yang besar dan kecil, dan dua heterodimer yang membentuk suatu heterotetramer yang aktif secara enzimatik (Fan TJ, *et al*, 2001/2005; Launay S, *et al*, 2005). Berdasarkan homologi dalam rangkaian asam amino tersebut, caspase dibagi menjadi tiga sub-famili, seperti yang ditunjukkan dalam tabel 3.1.

Tabel 3.1.

Anggota Sub-Famili dari Famili Caspase (*Cystein-dependent aspartat-directed protease*) (Fan TJ, *et al*, 2005).

Sub-Family	Peran	Anggota-anggota
I	Apoptosis activator	Caspase-2 Caspase-8 Caspase-9 Caspase-10
II	Apoptosis executioner	Caspase-3 Caspase-6 Caspase-7
III	Inflammatory mediator	Caspase-1 Caspase-4 Caspase-5 Caspase-11 Caspase-12 Caspase-13 Caspase-14

Caspase merupakan kunci perantara utama apoptosis yang diperlukan untuk perkembangan dan homeostasis jaringan (Chang HY, Yang X, 2000). Ada 100 substrat caspase dan ada 12 caspase sub klas proteases yang telah teridentifikasi yaitu caspase 1-14 (Hengartner MO, 2000). Proteases merupakan mediator penting untuk mendegradasi protein dan *recycling* protein. Ada

>500 proteases pada mamalia yang terdapat yang terlibat pada proses proteolisis (Fan TJ, *et al*, 2001/2005).

Semua caspase tersusun atas prodomain dan enzymatic domain. Heterogenitas diantara protease disebabkan karena perbedaan struktur prodomain dan diduga sebagai daerah yang menyebabkan perbedaan fungsi masing-masing caspase. Setiap caspase adalah cysteine aspartase dengan sisi aktifnya nukleofilik cysteine untuk pemecahan ikatan peptida asam aspartat dalam protein. Caspase disintesis dalam bentuk prekursor inaktif yang disebut procaspase. Proses proteolitik procaspase menghasilkan enzim caspase tetrameric yang aktif (Hengartner MO, 2000).

Berdasarkan data kinetik, spesifisitas substrat dan struktur procaspase maka secara konseptual caspase dibedakan menjadi inisiator caspase dan efektor caspase. Inisiator caspase berperan mengaktifkan efektor caspase sebagai respon sinyal kematian sel yang spesifik. Thornberry NA, *et al* (1997) menyebutkan bahwa inisiator procaspase diaktivasi oleh oligomer sedangkan efektor caspase biasanya diaktivasi oleh protease lain yang hampir semuanya adalah inisiator caspase, maupun oleh protease lain melalui trans-aktivasi. Secara *in vitro* telah diketahui bahwa procaspase 3 dan procaspase 7 dapat diaktivasi oleh caspase 6, 8, 9, 10. Chang HY, Yang X (2000) menyebutkan caspase 3, 6, 7 merupakan efektor caspase yang bersifat langsung maupun tidak langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams JM, Corey SL. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Anderson, C.W., Appela, W. 2002. Signaling to the p53 Tumor Suppressor through Pathways Activated by Genotoxic and Non-genotoxic Stress. In: Bradshaw, Dennis, E. editors. *Handbook of Cell Signaling*. New York: Academic Press: 126-129.
- Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Dingemans AM, van Mourik JC, Postmus PE, Pinedo HM, Giaccone G: Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2456-2466.
- Bourdon, J.C., Laurenzi, V.D., Melino, G., Lane, D. 2003. p53: 25 years of Research and More Question to answer in: *Cell Death and Differentiation*, 10th ed. p. 397-399.
- Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, Fraipont de F, Lantuejoul S, Frappat V, Ferretti G, Brichon PY, Moro-Sibilot D, Early detection of lung cancer: role of biomarkers, *Eur. Respir. J.* 2003; 39: 36s-44s.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumour. *Eur. Respir. J.* 2001; 18: 1059-68.
- Breuer RHJ, Postmus PE, Smith EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2005; 72: 313-330.

- Breuer RHJ, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2005; 72: 313-330.
- Chang JW, Chen YC, Chen CY, Chen JT, Chen SK, Wang YC. Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1639-1646.
- Chao DT, Krosmeier SJ. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annual Rev. Immunol.* 1998; 16: 395-419.
- Cox G, Louise Jones J, Andi A, Abrams KR, O'Byrne KJ. Bcl-2 is an independent prognostic faktor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34: 417-26.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* 1996; 274: 430-432.
- Denissenko MF, Shen JX, Tang M. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human p53 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 3893-3898.
- Fan T-J, Han L-H, Cong R-S and Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysical Sinica* 2005, 37 (11): 719-727.
- Foulkes, W.D. 2007.p53 Master and Commander. *N Engle J Med*, 357(25):2539-2541.
- Gessner C.BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of non small cell lung cancer. *Eur. Respir. J* 2002; 19: 134-140.

- Greenblatt MS, Bennett WP, Holstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4855-4878.
- Havrilesky L, Darcy KM, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, Berchuck A. Prognostic significance of p53 mutation and p53 over expression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 15; 21(20): 3814-25.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407; 770-776.
- Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 2001; 98(9): 2603-14.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
- Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, Porter AG, Schuter G. Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cell inducing caspase 3-dependent apoptosis. *Anticancer Research* 2003; 23: 1533-1539.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001 Dec; 11(12): 526-34.
- Launay S, *et al*, Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2005; 24: 5137-5148.
- Ling Bai and Wei-Guo Zhu. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2(4): 141-153, 2006.

- Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP. Role of Bcl-2 as a prognostic faktor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 89(1): 55-64.
- Poleri C, Morero JL, Nieva B. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopatologyc and immunohistochemical analysis. *Chest* 2003; 123: 1858-1867.
- Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95: 1437-1443.
- Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer (review). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(4Pt1): 1355-67.
- Schimmer AD, Hedley DW, Chow S, Pham NA, Chakrabartty A, Bouchard D, Mak TW, Trus MR, Minden MD. The BH3 domain of BAD fused to the Antennapedia peptide induces apoptosis via its alpha helical structure and independent of Bcl-2. *Cell Death Differ*. 2001; 8(7): 725-33.
- Singhal S, Vachani A, Ozerkis DA, Kaiser LR, Albelda SM. Prognosis implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis biomarker in non-small cell lung cancer: a review. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11(11): 3974-3986.
- Singhal S, Vachani A, Ozerkis DA, Kaiser LR, Albelda SM. Prognosis implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis biomarker in non-small cell lung cancer: a review. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11(11): 3974-3986.

Thornberry NA., Rano TA., Peterson EP., Rasper DM., Timkey T, Calvo-MG, Houtzager VM., Nordstrom PA Roy S., Vaillancourti JP., Chapman KT., and Nicholson DW. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B. Functional Relationships Established for Key Mediators of Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; Vol. 272 (29): 17907-17911.

Tock B, *et al*, 2003 Current clinical trials of G3139. *Oncology* 2003; 17: 1244-1258.

Viktorsson K, Petris L De, Lewensohn. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Bioche. and Biophys. Res. Comm* 2005; 331: 868-880.

Zhang Y, Xiong Y, and Yarbrough WG: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53:ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*1998; 92: 725-734.

kanker, lalu mengambil H_2O_2 dan/atau menghambat fosforilasi protein dengan fitokimia fenolik yang mempunyai aktivitas antioksidan akan memotong sirkuit peristiwa penghantaran sinyal dan akan menghambat proliferasi sel kanker (Loo G, 2003).

Pada aspek lain, tampaknya fitokimia secara paradoks dapat menginduksi stres oksidatif ke tingkat yang menghambat pertumbuhan atau letal terhadap sel kanker. Pada peristiwa apapun, jumlah ROS yang tidak dapat ditoleransi menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap DNA serta aktivasi kaskade MAPK dan kemudian terhentinya pertumbuhan dan kerusakan DNA - gen yang dapat diinduksi (seperti GADD45 dan GADD153), serta gen yang terlibat dalam menginisiasi terhentinya siklus sel (seperti WAF-1), dan apoptosis (seperti Bax).

Satu ciri yang telah dikenal dari fitokimia fenolik adalah bahwa mereka mempunyai aktivitas antioksidan, yang terutama berasal dari kelompok hidroksil fenolik yang mampu memberi atom hidrogen saat mengambil ROS. Ide yang telah dikembangkan di atas bahwa H_2O_2 , atau produk reaksi OH, adalah esensial untuk transduksi sinyal dan aktivasi gen spesifik yang memudahkan proliferasi sel kanker. Jadi, mengambil ROS ini dengan fitokimia fenolik akan menghambat proses seluler tersebut dan proliferasi sel kanker.

Fitokimia fenolik dapat menghambat efek H_2O_2 terhadap peristiwa penghantaran sinyal MAPK dan aktivasi faktor transkripsi sensitif-redoks, seperti NF- κ B dan AP-1. Dalam beberapa contoh studi terkini, fenolik teh, *epigallocatechin gallate* (EGCG), menghambat aktivasi MAPK yang diinduksi pada keratinosit epidermal manusia dengan memaparkan sel ke radiasi ultraviolet (UV-B) (Katiyar SK, *et al*, 2001). UV-B menyebabkan pembentukan H_2O_2 intrasel dan meningkatkan fosforilasi ERK, JNK, dan p38 MAPK. Karena antioksidan standar, askorbat, juga

menghambat efek UV-B, dapat disimpulkan bahwa EGCG menghambat aktivasi MAPK yang diinduksi-UV-B dengan cara mengambil H_2O_2 . Resveratrol, suatu fenolik yang terdapat dalam jumlah besar pada anggur, mencegah aktivasi NF- κ B yang diinduksi oleh TNF pada sel U-937, sel Jurkat, sel HeLa, dan sel glioma H4 (Manna SK, *et al*, 2000). TNF juga menstimulasi pembentukan ROS dan aktivasi MAPK dan JNK *downstream*, tapi efek ini dihambat oleh resveratrol. Selain itu, resveratrol mencegah aktivasi NF- κ B yang diinduksi oleh phorbol myristate acetate (PMA), lipopolisakarida, asam okadat, ceramide, dan yang terpenting, H_2O_2 .

Pada penelitian karsinogenesis, teh hijau dan/atau senyawa teh hijau menghambat pembentukan lesi DNA 0,6-methylguanin dan 8-hydroxydeoxyguanosin (8-OH-dGue) dan tumor genesis yang terinduksi kimia pada tikus, menghambat metil-transferasi DNA dan gen-gen metilasi-*silenced* teraktivasi pada proses kanker (Fang MZ, *et al*, 2003). Frei B, Higdon JV (2003), melakukan studi terkait dengan aktivitas antioksidan teh hijau dan menunjukkan bahwa polifenol dapat berfungsi secara langsung sebagai antioksidan melalui (a) penghambat faktor transkripsi sensitif-redoks seperti NF- κ β dan protein aktivator-1, (b) penghambat enzim-enzim pro-oksidan seperti sintesis NO, lipoksigenase, siklogenase dan xanthin oksidase atau enzim-enzim penginduksi fase II dan antioksidan seperti *glutathion S-transferase* dan dismutase super oksida.

Induksi apoptosis cukup penting untuk menunjukkan bahwa aktivitas apoptotik *in vivo* dapat digunakan sebagai alat *screening* fitokimia fenolik anti kanker yang potensial (Hsu S, *et al*, 2003). Sejumlah polifenol prooksidan (misalnya *resveratrol*) mungkin bersifat sitotoksik (Hadi SM, *et al*, 2002) dan dapat

memblok serangan inisiasi pada DNA serta meregulasi jalur sinyal sel (Yeh CW, *et al*, 2003).

Senyawa fenolik yang banyak terdapat di alam diantaranya polifenol dan asam fenolat. Polifenol berperan dalam mencegah kanker dan anti genotoksin. Polifenol merupakan senyawa fenolik alam yang memiliki sifat antioksidan (Zhai S, *et al*, 2008) dan berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker (Singh RP, *et al*, 2005). Beberapa polifenol telah dibuktikan memiliki sifat antioksidan dan anti-cancer karena dapat bertindak sebagai *chain breakers*, *radical scavengers* dan *metal chelators* yang bergantung pada struktur kimia sehingga mempengaruhi efek antioksidan polifenol (Giovanni C, *et al*, 2007). Sebagai anti-oksidan dan anti-cancer, polifenol memperbaiki ketahanan sel dan sebagai pro-oksidan, polifenol dapat menginduksi apoptosis dan kematian sel serta menghambat proliferasi sel. Polifenol memiliki aktifitas antioksidan dan polifenol secara spesifik sebagai pengatur proses *apoptotic* dalam berbagai cara tergantung pada konsentrasi protein, sistem sel, jenis atau tingkat proses patologis serta sebagai kemoterapi pencegahan (*chemoprevention*) serta terapi kanker (Giovanni C, *et al*, 2007).

Resveratrol mempunyai efek serupa pada peristiwa yang berakibat aktivasi faktor transkripsi, seperti pada kasus AP-1 (Yu R, *et al*, 2001). Memaparkan sel HeLa terhadap PMA atau radiasi ultraviolet (UV-C) meningkatkan transkripsi dari gugusan gen pelapor mengandung elemen respons AP-1. Memberi sel resveratrol terlebih dahulu menurunkan aktivasi transkripsional gugusan. Pemberian resveratrol juga menghambat aktivasi ERK, JNK, p38 MAPK yang disebabkan oleh PMA dan UV-C. Dalam menghubungkan temuan-temuan ini, ekspresi berlebihan mutan MAPK dominan-negatif dalam sel melemahkan aktivasi AP-1 yang diinduksi oleh PMA dan UV-C. Efek resveratrol adalah

melibatkan penghambatan protein tirosin kinase dan protein kinase C, karena penghambat selektif enzim ini menghambat aktivasi MAPK dan AP-1.

Hasil penelitian Katiyar SK, *et al* (2001); Manna SK, *et al*, (2000); Yu R, *et al*, (2001) menunjukkan bahwa fitokimia fenolik dapat mengambil H₂O₂ konstitutif dalam jumlah besar pada sel kanker, sehingga memblokir penghantaran sinyal MAPK, aktivasi NF-κB dan AP-1, dan ekspresi gen responsif yang menstimulasi proliferasi sel kanker. Menurut Hsu TC, *et al* (2000); Li JJ, *et al* (2000), oleh sebab aktivasi terus menerus NF-κB dan AP-1 dalam sel kanker mempertahankan fenotipe yang memudahkan proliferasinya, menekan aktivitas faktor transkripsi ini dengan fitokimia fenolik diharapkan akan menghalangi kemampuan sel kanker untuk tumbuh.

Berbagai hasil studi menunjukkan, fitokimia fenolik menghambat proliferasi sel kanker dengan menginduksi penghentian siklus sel dan/atau apoptosis, yang dapat karena fitokimia fenolik mengambil H₂O₂ atau ROS lainnya yang diperlukan oleh sel kanker untuk vitalitas dan viabilitasnya. Sebagai contoh, fitokimia fenolik, apigenin, menginduksi penghambatan pertumbuhan sel karsinoma tiroid anaplastik manusia yang kemudian diikuti apoptosis (Yin F, *et al*, 1999). Terdapat penghambatan autofosforilasi tirosin EGFR dan fosforilasi *downstream* MAPK. Jadi, dalam mengerahkan efeknya, apigenin dapat secara langsung menghambat fosforilasi protein, atau alternatifnya, mengambil H₂O₂ yang mengaktifkan protein kinase. Resveratrol menginduksi penghentian siklus sel fase-G1 pada sel karsinoma epidermoid manusia A431 (Ahmad N, *et al*, 2001). Terdapat penurunan ekspresi protein dari siklin dan *cyclin-dependent kinase* (CDK) beserta dengan penurunan aktivitas CDK yang normalnya memediasi berlangsungnya siklus.

Konsekuensinya, ekspresi penghambat CDK, p21, meningkat sehingga apoptosis menjadi hasil akhirnya. Telah ditunjukkan bahwa resveratrol menginduksi apoptosis melalui aktivasi JNK yang berakibat fosforilasi dan aktivasi p53 (She QB, *et al*, 2002), yang merupakan faktor transkripsi yang mengaktivasi gen Waff-1, yang mengkode untuk p21, atau gen Bax, yang produk translasinya diketahui memudahkan apoptosis. Fitokimia fenolik lain seperti quercetin dan genistein menginduksi apoptosis dalam sel karsinoma pankreatik, di mana depolarisasi mitokondria, pelepasan sitokrom c, dan aktivasi kaspase merupakan peristiwa apoptotik dini (Mouria M, *et al*, 2002). Oleh karena itu, karena fitokimia fenolik mempunyai aktivitas antioksidan, logis untuk berpikir bahwa fitokimia fenolik menginduksi penghentian siklus sel dan apoptosis dalam sel kanker dengan mengambil H_2O_2 , sehingga mengurangi jumlahnya sendiri sebagai molekul esensial yang dibutuhkan untuk eksistensi sel kanker.

Beberapa fitokimia fenolik mampu membentuk ROS. EGCG, quercetin, dan asam gallat membentuk H_2O_2 bergantung waktu dan konsentrasi ketika dimasukkan ke media kultur sel (Long LH, *et al*, 2000). Jadi, mengobati sel kanker kultur dengan ini dan kemungkinan fitokimia fenolik lain dapat berakibat produksi H_2O_2 ekstra sel substansial yang dapat berdifusi ke dalam sel dan menyebabkan efek stres atau sitotoksik. Terkait stres seluler, mengobati sel karsinoma mammae manusia MCF-7 dengan quercetin 15 μM selama 24 jam menginduksi aktivasi transkripsional, melalui elemen respons antioksidan, dari NAD(P)H: gen oksidoreduktase quinone (Valerio LG, *et al*, 2001), yang mempunyai peran penting dalam detoksifikasi fase II. Namun, apoptosis terjadi pada sel epitel bronkus manusia yang bertransformasi-gen Ha-ras setelah diberi 25 μM EGCG atau katekin teh terkait selama 24 jam (Yang GY, *et al*, 2000). Kematian

sel diakibatkan oleh H₂O₂ karena katekin menginduksi pembentukan H₂O₂ dan apoptosis dicegah oleh katalase. Konsisten dengan pandangan bahwa H₂O₂ terlibat, katekin teh menurunkan fosforilasi protein c jun, yang diperkirakan menurunkan aktivitas AP-1 yang dibutuhkan untuk mengaktivasi secara transkripsional beberapa gen yang memperbaiki viabilitas sel kanker. Hasil penelitian Sakagami H, *et al* (2001) apoptosis yang diinduksi oleh EGCG dalam sel karsinoma squamosa oral manusia juga disimpulkan akibat pembentukan H₂O₂ dalam medium kultur sel. Kemampuan EGCG dosis non-lethal untuk meningkatkan ekspresi gen COX-2 bergantung-MAPK dalam makrofag RAW-264.7 dapat dijelaskan oleh EGCG yang membentuk H₂O₂ tambahan dalam jumlah yang dapat ditoleransi (Park JW, *et al*, 2001).

Induksi ROS dalam jumlah yang tak dapat ditoleransi pada sel kanker oleh fitokimia fenolik menginisiasi apoptosis melalui aktivasi MAPK. Hal ini serupa dengan apa yang ditemukan pada penginduksi apoptosis lain. Sebagai contoh, memaparkan sel promonositik U-937 terhadap logam berat toksik, kadmium, berakibat pada akumulasi H₂O₂, dan juga fosforilasi p38 MAPK, diikuti oleh apoptosis (Galan A, *et al*, 2000). Katekin teh termasuk EGCG mengaktivasi MAPK sebelum menginisiasi apoptosis yang dimediasi caspase (Chen C, *et al*, 2000). Resveratrol menginduksi apoptosis pada lini sel karsinoma tiroid (Shih A, *et al*, 2002). Terdapat peningkatan protein p53, yang dimediasi oleh jalur Ras/MAPK kinase/MAPK.

Induksi apoptosis pada sel kanker oleh beberapa fitokimia fenolik seperti EGCG dapat terkait dengan kerusakan oksidatif terhadap DNA. Hasil penelitian Johnson MK, *et al* (2000) menggunakan EGCG, dan hasil penelitian Kelly MR, *et al* (2001) menggunakan kurkumin, menginduksi terputusnya *single strand*

pada DNA limfosit-T Jurkat. EGCG meningkatkan pembentukan H_2O_2 dalam media sel kultur tapi kurkumin tidak (Kelly MR, *et al*, 2001), menunjukkan bahwa kurkumin diambil oleh sel dan kemudian menginduksi pembentukan ROS intrasel. Apabila kerusakan oksidatif DNA tidak dapat diperbaiki, apoptosis akan terjadi.

Kapasitas fitokimia fenolik untuk membentuk ROS dalam jumlah yang cukup untuk membunuh sel kanker menimbulkan pertanyaan apakah sel normal sama rentannya terhadap efek prooksidan fitokimia fenolik. Relevan terhadap pertanyaan ini, dibandingkan sel normal, sel kanker lebih rentan untuk terbunuh oleh obat anti kanker mungkin karena sel kanker telah berada dekat ambang batas untuk ROS yang dapat ditoleransi. Sebagai contoh, sel-sel NIH 3T3 yang ditransformasi dengan onkogen Ras lebih sensitif terhadap stres oksidatif dan obat anti kanker seperti cis-platin (Benhar M, *et al*, 2001). Theaflavin monogallat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon Caco-2 tapi tidak pada sel normal di sekitarnya (Lu J, *et al*, 2000). Mereka juga menginduksi apoptosis pada sel manusia WI38 yang ditransformasi-SV40 tapi tidak pada sel WI38 yang belum bertransformasi. Sel karsinoma squamosa oral manusia dan sel tumor kelenjar liur lebih rentan daripada fibroblast gusi manusia normal terhadap apoptosis yang diinduksi oleh fitokimia fenolik yang dikenal sebagai tanin (Sakagami H, *et al*, 2000).

4.2. Penghambatan Apoptosis oleh Polifenol

Polifenol dapat mempengaruhi keseluruhan proses karsinogenesis dengan beberapa mekanisme. Yang pertama dari semuanya, polifenol eksogen disuplai dengan diet (Giovannini C, *et al*, 2007; Yao LH, *et al*, 2004), berkontribusi menetralkan terjadinya stres oksidatif, dan dengan melakukan hal tersebut,

polifenol dapat berkontribusi terhadap pencegahan dan perkembangan kanker. Polifenol tersebut dapat memodulasi stres oksidatif pada sel kanker, dengan cara mempengaruhi transduksi sinyal, aktivasi faktor transkripsi sensitif-redoks, dan ekspresi gen spesifik yang mempengaruhi proliferasi dan apoptosis sel (Porrini M, *et al*, 2005).

Beberapa jenis polifenol (asam fenol, *tannin* terhidrolisa, dan flavonoid) menunjukkan efek anti-karsinogenik dan anti-mutagenik. Polifenol dapat mengganggu beberapa langkah yang mengarah pada perkembangan tumor ganas, menginaktivasi karsinogen, menginhibisi ekspresi gen mutan dan aktivitas enzim yang terlibat dalam aktivasi pro-karsinogen dan mengaktifasi sistem enzimatik yang terlibat dalam detoksifikasi xenobiotik (Bravo L, 1998). Namun, beberapa polifenol telah dilaporkan bersifat mutagenik dalam uji mikroba dan ko-karsinogen atau promotor dalam menginduksi karsinogenesis kulit dengan keberadaan karsinogen lain (Chung KT, *et al*, 1998). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa polifenol, khususnya flavonoid, selain mempunyai efek antioksidan protektif pada DNA dan ekspresi gen, menghambat inisiasi, promosi dan perkembangan tumor, mungkin oleh mekanisme yang berbeda.

Anggur banyak mengandung senyawa yang tampak menunjukkan sifat anti-kanker, termasuk antara lain asam gallat (*gallic acid*), asam *caffeic*, asam ferulat (*ferulic acid*), *catechin*, *quercetin* dan *resveratrol*. Asam gallat bersifat anti-mutagenik dengan uji Ames (Hour TC, *et al*, 1999) dan bersifat hepatoprotektif terhadap toksisitas karbon tetraklorida (Kanai S, Okano H, 1998). Percobaan dengan tikus transgenik yang secara spontan mengalami tumor kulit, penambahan ekstrak anggur merah padat pada diet mereka menyebabkan suatu penundaan yang nyata dalam perkembangan tumor (Clifford AJ, *et al*, 1996).

Peneliti lain menunjukkan bahwa kombinasi *resveratrol* dan *quercetine* memberikan suatu efek sinergis dalam menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel karsinoma squamosa oral pada manusia (El Attar TMA, Virji AS, 1999). Namun, dalam penelitian ini hasil terbaik diamati dengan pengenceran anggur merah. Sejak *resveratrol* dan *quercetin* terdapat dalam konsentrasi rendah, polifenol lain juga dapat bertanggung jawab untuk efek tersebut dan untuk potensiasi inhibisi pertumbuhan sel.

Selain itu, bukti lain mengindikasikan bahwa polifenol dapat secara langsung berinteraksi dengan protein yang bertanggung jawab bagi regulasi proses apoptotik seperti pelepasan sitokrom c dengan aktivasi caspase-9 dan caspase-3 berikutnya (Ong CS, *et al*, 2004; Shimizu M, *et al*, 2005; Selvendiran K, *et al*, 2006; Michels G, *et al*, 2005), peningkatan caspase-8 dan kadar t-Bid (Selvendiran K, *et al*, 2006), *down-regulation* ekspresi Bcl-2 dan Bcl-XL, penguatan ekspresi Bax dan Bak (Selvendiran K, *et al*, 2006; Kuo PL, Lin CC, 2003).

Resveratrol menyebabkan siklus sel tertahan dan menginduksi apoptosis pada banyak sel kanker manusia (Giovannini C, *et al*, 2007). Induksi apoptosis oleh resveratrol dilaporkan berhubungan dengan peningkatan aktivitas caspase (Wolter F, *et al*, 2001), penurunan kadar Bcl-2 dan Bcl-XL, serta peningkatan kadar Bax (Billard C, *et al*, 2002). Mekanisme pro-apoptotik ini telah dilaporkan seringkali berhubungan dengan aktivasi p53 (Kim YA, *et al*, 2002).

Demikian juga curcumin, suatu senyawa polifenolik dari rhizoma tanaman *Curcuma longa* (kunyit) yang menginduksi apoptosis dengan menekan ekspresi konstitutif Bcl-2 dan Bcl-XL, serta mengaktivasi caspase-7 dan caspase-9 dalam lapisan limfoma (Shishodia S, *et al*, 2005) serta garis sel myeloma multipel (Bharti AC, *et al*, 2003).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1466-473.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6913-6926.
- Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (*diferuloylmethane*) down-regulates the constitutive activation of nuclear faktor-kappa B and Ikappa-Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003; 101: 1053-62.
- Billard C, Izard JC, Roman V, Kern C, Mathiot C, Mentz F, Kolb JP. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1991-2002.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56:317-33.

- Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1369-78.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998; 38:421-464.
- Clifford AJ, Ebeler SE, Ebeler JD, Bills ND, Hinrichs SH, Teissedre P-L, Waterhouse AL. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:748-756.
- Elattar TMA, Virji AS. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999; 19:5407-5414.
- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7563-70.
- Frei B and Higdon J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *Journal of Nutrition* 2003; 133: 3275S-3284S.
- Galan A, Garcia-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, deBlas E, Kazanietz MG, Aller P. Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 11418-11424.

- Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, Archivio D' M and Masella R. Apoptosis in cancer and arteriosclerosis: polyphenol activities. *Ann Ist Suoer Sabita* 2007; 43(4): 406-416.
- Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, Archivio D' M and Masella R. Apoptosis in cancer and arteriosclerosis: polyphenol activities. *Ann Ist Suoer Sabita* 2007; 43(4): 406-416.
- Hour TC, Liang YC, Chu IS, Lin JK. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffiene. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:569-579.
- Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, Porter AG, Schuter G. Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cell inducing caspase 3-dependent apoptosis. *Anticancer Research* 2003; 23: 1533-1539.
- Hsu TC, Young MR, C marik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)-and nuclear faktor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1338-1348.
- Johnson MK, Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative DNA damage to cellular DNA, *Mutation Res* 2000; 459: 211-218.
- Kanai S, Okano H. Mechanism of protective effects of sumac gall extract and gallic acid on progression of CC14-induced acute liver injury in rats. *Am J Chin Med* 1998; 26:333-341.

- Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of UV B-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharm* 2001; 176: 110-117.
- Kelly MR, Xu J, Alexander KE, Loo G. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Res* 2001; 485: 309-318.
- Kim YA, Choi BT, Lee YT, Park DI, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Resveratrol inhibits cell proliferation and induced apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Onc. Rep.* 2004; 11: 441-6.
- 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.
- Li JJ, Cao Y, Young MR, Colburn NH. Induced expression of dominant-negative c jun down regulates NF kappaB and AP-1 target genes and suppresses tumor phenotype in human keratinocytes. *Mol Carcinog* 2000; 29: 159-169.
- Long LH, Clement MV, Halliwell B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 50-53.
- Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem.* 2003; 14(2): 64-73.

- Lu J, Ho CT, Ghai G, Chen KY. Differential effects of Theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6465-6471.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000; 164: 6509-6519.
- Michael G, Watjen W, Niering P, Steffan B, Thi QH, Chovolou Y, Kampkotter A, Bast A, Proksch P, Kahl R. Pro-apoptosis effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology* 2005; 206: 337-48.
- Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, Pandol SJ. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer* 2002; 98: 761-769.
- Ong CS, Tran E, Nguyen TT, Ong CK, Lee SK, Lee JJ, Ng CP, Leong C, Huynh H. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep* 2004; 11: 727-33.
- Park JW, Choi YJ, Suh SI, Kwon TK. Involvement of ERK and protein tyrosine phosphatase signaling pathways in EGCG-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw 264,7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 721-725.

- 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: 93-99.
- Sakagami H, Arakawa H, Maeda M, Satoh K, Kadofuku T, Fukuchi K, Gomi K. Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxidants. *Anticancer Res* 2001; 21: 2633-2641.
- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Ito H, Hatano T, Yoshida T. Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines: a possible mechanism. *Phytomedicine* 2000; 7: 39-47.
- Selvendiran K, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, Yano H, Kojiro M, Sata M. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res* 2006; 66: 4826-34.
- She QB, Huang C, Zhang Y, Dong Z. Involvement of c jun NH2-terminal kinases in resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis. *Mol Carcinog* 2002; 33: 244-250.
- Shi Y. Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 2002; 10: 285-288.

- Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth faktor receptor and human epidermal growth faktor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin CancerRes* 2005; 11: 2735-46.
- Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 700-13.
- Singh RP, Agarwal P, Yim D, Agarwal C, Agarwal R. Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis in human prostate cancer cells: structure-activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis* 2005; 26: 845-85.
- Valerio LG, Kepa JK, Pickwell GV, Quattrochi LC. Induction of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol Lett* 2001; 119: 49-57.
- Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J. Down regulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrolinduced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* 2001; 131: 2197-203.
- Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. Effect of black and green tea polyphenols on cjun phosphorylation and H2O2 production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2035-2039.

- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanungsong R, Chen SS. Flavonoids I food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2004; 59: 113-22.
- Yeh CW, Chen WJ, Chiang CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics Journal* 2003; 3: 267-276.
- Yin F, Giuliano AE, van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* 1999; 19: 4297-4303.
- Yu R, Hebbar V, Kim DW, Mandlekar S, Pezzuto JM, Kong AN. Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 217-224.
- Zhai S, Dai R, Friedman F, Vestal R. Comparative inhibition of human cytochromes p450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* 2008; 26: 989-992.

BAB V

TEKNIK MOLEKULERPROLIFERASI DAN APOPTOSISDALAM PENELITIAN ILMIAH

Standar Kompetensi

Sesudah mempelajari Bab ini, mahasiswa diharapkan dapat:

1. *Menyebutkan teknik molekuler proliferasi sel dalam percobaan di laboratorium*
2. *Menyebutkan teknik molekuler apoptosis sel dalam percobaan di laboratorium*
3. *Menjelaskan bagaimana proses mendeteksi proliferasi sel dengan metode AgNOR*
4. *Menyebutkan prosedur pewarnaan AgNORs*
5. *Menjelaskan proses pewarnaan apoptosis sel dengan metode TUNEL*



5.1. Dasar Teori

Proliferasi sel menghasilkan dua sel yang berasal dari satu sel. Keadaan ini membutuhkan pertumbuhan sel yang kemudian diikuti oleh pembelahan (divisi) sel. pertumbuhan sel yang tidak terkendali merupakan ciri khas kanker. Sel kanker secara umum

berisi biomolekul yang diperlukan untuk bertahan, proliferasi, diferensiasi, kematian sel dan ekspresi tipe sel dengan fungsi khusus (*cell-typespecific functions*). Kegagalan regulasi fungsi inilah yang menghasilkan perubahan fenotip dan kanker.

Pada jaringan normal, proliferasi sel mengarah kepada penambahan jaringan. Dimana jumlah sel tidak hanya tergantung kepada proliferasi sel tetapi juga oleh kematian sel. Kematian sel terprogram (apoptosis) adalah proses dikeluarkannya sel-sel yang rusak. Keseimbangan antara produksi sel baru dan kematian sel itulah yang mempertahankan sel yang tepat pada jaringan (homeostasis).

5.1.1. Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR

Nucleolar Organizer Region (NOR) merupakan lengkung DNA yang menempati area khusus dalam kromosom 13, 14, 15, 21, dan 22 yang diketahui sebagai tempat gen ribosomal DNA (rDNA). NOR berperan penting dalam sintesis protein, membantu menjaga perpanjangan konfigurasi DNA, dan mengatur transkripsinya (Asri A, 2004). Visualisasi NOR dengan menggunakan pewarnaan perak diperkenalkan oleh Ploton dkk pada tahun 1986 yang kemudian dimodifikasi oleh Ofner dkk tahun 1994 dengan menambahkan formalin untuk fiksasi (Utami S. A, 2008). Untuk melakukan skoring jumlah deposit perak pada teknik ini digunakan metode-metode berbeda. Metode yang paling sering digunakan adalah dengan menghitung secara manual jumlah titik perak intranuklear per sel pada setidaknya 100 sel dengan menggunakan mikroskop cahaya. Metode lain yang lebih mutakhir adalah dengan menghitung total area deposit perak dengan bantuan computer (Sijabat L, 2009).

5.1.2. Prosedur Pewarnaan AgNORs (*Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions*)

Bahan-bahan yang digunakan adalah: 1) Perak nitrat kristal, 2) Gelatin kristal, 3) Asam format larutan 1%, dibuat dengan cara asam format 1 cc dalam 99 cc aquadest dan Aquades.

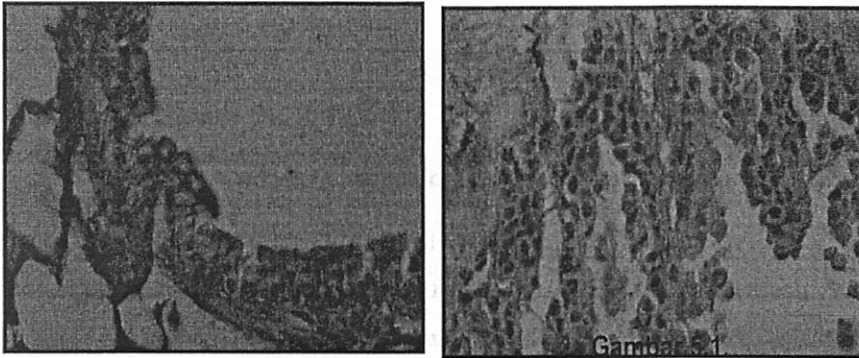
Prosedur pembuatan campuran: a) dibuat larutan gelatin 2% dengan cara 2 gr letatin dilarutkan dalam asam format larutan 1%. Dapat dibuat stok (dalam suhu kamar) dan dibuat larutan perak nitrat 50% dengan cara 50 gr nitrat dilarutkan dalam aquades sampai 100 cc. dapat dibuat stok (dalam suhu kamar).

Prosedur pewarnaan antara lain: a) disediakan blok paraffin dipotong setebal 3 mikrometer, kemudian dilakukan deparafinisasi dalam xylene dan dilakukan dehidrasi, b) Jaringan atau sitologi yang siap diwarnai, dimasukkan ke dalam ruang gelap, c) dicampurkan segera larutan gelatin 2% (1 bagian) dengan larutan perak nitrat 50% (2 bagian) pada saat akan mewarnai di ruang gelap, d) Jaringan atau sitologi ditetesi dengan campuran kedua larutan tersebut, kemudian di inkubasi selama 45-60 menit (untuk jaringan) dan 20-30 menit, e) dicuci dengan aquades dengan cara diperlakukan tiga kali cucian, f) dilakukan dehidrasi dengan alcohol bertingkat 80%-90% absolute, g) di sini tidak dilakukan *counter stain*, h) dilakukan clearing dengan xylol dan mounting dengan Canada balsam atau entelan. Diamati dengan mikroskop cahaya, jumlah bercak hitam di dalam inti sel dan dihitung setiap 100 sel.

Proses selanjutnya, masing-masing blok paraffin dipotong lagi setebal 4 mikron kemudian diberi pewarnaan perak nitrat untuk pemeriksaan aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah bercak NORs yang ditandai dengan anak inti sel yang berwarna hitam. Tiap slide dinilai 5 lapang pandang dengan pembesaran 400X. Aktivitas proliferasi sel ditunjukkan dengan

bertambah banyaknya sel kanker yang dapat dideteksi melalui jumlah nucleolus pada inti sel kanker dengan pewarnaan perak nitrat.

11



Inhibisi Proliferasi Sel. Bercak NOR pada nucleus dengan pewarnaan silver. Tampak sel yang berproliferasi anak inti, pembesaran 400X (Watuguly T, dkk, 2013).

5.2. Dasar Teori

Apoptosis (berasal dari kata yang berarti "*meninggalkan jauh dari*") menyebabkan kematian sel terprogram. Kegagalan sel untuk mengalami apoptosis fisiologik dapat menyebabkan perkembangan aberan, proliferasi tumor yang tidak terkontrol, atau penyakit autoimun. Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik dan intrinsik. Yang termasuk pada sinyal ekstrinsik adalah faktor hormon, faktor pertumbuhan, nitric oxide, dan sitokin.

Semua sinyal tersebut harus dapat menembus membran plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon. Sinyal intrinsik adalah respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Pengikatan reseptor nukleus oleh glukokortikoid,

panas, radiasi, kekurangan nutrisi, infeksi virus dan hipoksia merupakan keadaan yang dapat menimbulkan pelepasan sinyal apoptosis intrinsic melalui kerusakan sel. Homeostasis antara proliferasi sel dan kematian sel yang terprogram (apoptosis) secara normal dipertahankan untuk menyediakan integritas jaringan dan organ.

5.2.1. Pewarnaan Sel Apoptosis dengan TUNEL

Apoptosis adalah kematian sel terprogram (*programmed cell death*) yang bertujuan untuk mempertahankan kestabilan populasi sel. Apoptosis berperan penting dalam perkembangan biologis dan pemeliharaan jaringan yang aktif membelah supaya selalu dalam kondisi *steady state*. Kegagalan pengaturan apoptosis dapat menyebabkan sel membelah tanpa terkendali, yang disebut sebagai kanker. Peningkatan apoptosis merupakan suatu upaya yang dikembangkan sebagai terapi kanker. Pemeriksaan apoptosis dengan metode TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) dapat memberikan gambaran proses apoptosis pada tingkat sel tunggal sehingga lebih spesifik dan memiliki akurasi tinggi (Nugrahaningsih, Yuniastuti A, 2004).

Metode untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dapat didasarkan pada karakteristik apoptosis itu sendiri, contohnya adalah fragmentasi DNA. Metode yang umum untuk mendeteksi fragmentasi DNA secara enzimatik adalah TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*). Reagen TUNEL terdiri dari enzim terminal transferase yang bertugas mengenali ujung-ujung 3'OH (nick end) yang dihasilkan oleh fragmentasi DNA dan fluorescein-dUTP untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang dapat diamati menggunakan mikroskop fluoresensi atau flow cytometry.

Untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non-apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan, digunakan metode *double staining* menggunakan reagen TUNEL dan propidium iodida. TUNEL hanya mendeteksi sel apoptosis dan memberikan fluoresensi hijau, sedangkan propidium iodida mendeteksi sel non-apoptosis dan memberikan fluoresensi merah.

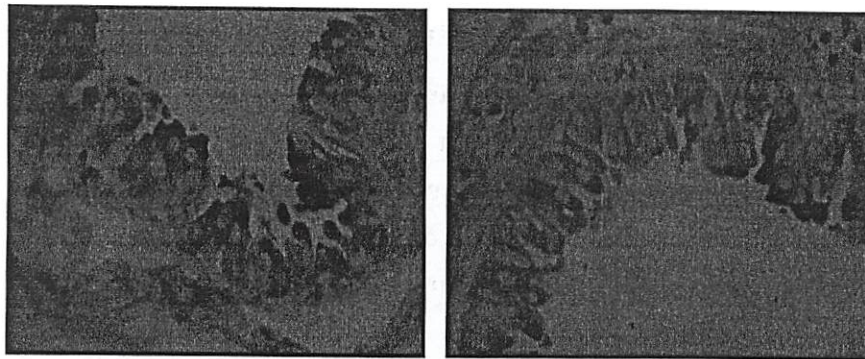
5.2.2. Prosedur Pewarnaan TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

Prosedur pewarnaan antara lain: a) Blok paraffin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-4 μ , tempelkan pada objek glass yang telah diolesi poly-L-Lysine, b) Deparafinisasi dalam xylene, alcohol bertingkat dan aquades, c) Beri sitrat buffer; 60 $^{\circ}$ dalam microwave selama 38 menit, d) Bilas dengan PBS 3 kali (masing-masing 2 menit), e) Beri proteonase K: 15 menit, f) Cuci dengan H₂O 2 kali (2 menit), g) Masukkan dalam 3% H₂O₂ selama 15 menit, h) Cuci dengan PBS 3 kali, i) Masukkan ke dalam equilibrium buffer selama 10 menit pada suhu kamar, j) Masukkan pada *working trength* TdT enzyme yang dilengkapi dioxygenin pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam, masukan stop buffer 15 menit, cuci dengan PBS 3 kali, masukan anti digoxigenin yang dilabel peroxidase selama 30 menit, cuci dengan H₂O₂ 3 kali (masing-masing 1 menit), DAB-peroxida selama 10 menit, cuci dengan H₂O, dilanjutkan dengan dehidrasi, cleaning dan mounting.

Identifikasi sel apoptosis menggunakan metode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated-D-Uridine Triphosphatase Nick and Labelling*). Preparat histologik diproses dan diwarnai dengan kit TUNEL. Jumlah sel apoptosis yang terekspresi positif dilakukan perhitungan dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari sel tumor dalam epitel

bronkiolus dari 5 lapang pandang dan menghitung sel TUNEL-positif diantara sel-sel tersebut dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400x.

Penggunaan metode TUNEL memperlihatkan derajat spesifitas tinggi untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis. Perhitungan jumlah sel yang mengalami kematian sel pada epitel bronkiolus sebagai reaksi terhadap paparan polifenol mahkota dewa, dapat dilakukan dengan menghitung setiap 100 sel pada 5 lapang pandang dan diambil nilai rata-rata.



Gambar 5.2.

Induksi Indeks Apoptosis. Tampak badan apoptotik (*apoptotic body*) dengan pengecatan TUNEL. Pengecatan TUNEL tercatat warna coklat pada sel epitel bronkiolus. Pengamatan dengan pembesaran 400X dengan pengecatan TUNEL (Watuguly T, *dkk*, 2013).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. Prosedur Tetap (Protap) Pencegahan TUNEL. Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Dikutip dari <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>.
- Asri A, 2004. Pengaruh pemberian perasan seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis, dan perubahan histopatologi mukosa kolon wistar. Semarang: Universitas Diponegoro (Master Thesis).
- Nugrahaningsih dan Yuniastuti A, 2004. Identifikasi apoptosis dengan metode tunnel pasca pemberian ekstrak sambiloto dan pengaruhnya terhadap volume tumor. *Jurnal Sains dan Teknologi* 2014; Vol. 12 No. 2.
- Sijabat L, 2009. Pengaruh pemberian ekstrak sponge haliclona sp terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel adenocarcinoma mammae mencit C3H. Semarang: Universitas Diponegoro (Master Thesis).
- Utami SA, 2008. Efek cyclophosphamid-transfer faktor terhadap proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor adeno ca mammae mencit. Semarang: Universitas Diponegoro (Master Thesis).
- Watuguly Theopilus W, Indranila KS, Papilaya Pamela Mercy, Edi Dharmana. Pengaruh Polifenol Mahkota Dewa Terhadap Proliferasi Sel dan Apoptosis pada Mencit Strain Balb/C yang Diinduksi Benzo (a) Pyrene (BaP). *Med. Med. Indo.* 2013; 47: 44-55.

TENTANG PENULIS



Dr. Theopilus Wilhelmus Watuguly, M.Kes.

Staf pengajar pada Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Fakultas KIP Universitas Pattimura Ambon.

Lahir di Waturu, 29 Nopember 1976.

Lulus Sarjana Pendidikan Biologi pada tahun 2000 dari Jurusan Pendidikan MIPA FKIP-Universitas Pattimura (UNPATTI) Ambon. Pendidikan Magister-S2 lulus tahun 2003, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Konsentrasi Biologi Kedokteran (Biomedik) Universitas Airlangga (UNAIR) Surabaya. Pendidikan Doktor-S3 lulus tahun 2012, Program Studi Ilmu Kedokteran, Konsentrasi Kedokteran Dasar (Biomedik) Universitas Diponegoro (UNDIP) Semarang dengan bidang riset biologi molekuler.

Ketertarikan penulis dalam mendalami penelitian kanker dimulai saat mengikuti studi pada Program Doktor Ilmu Kedokteran. Pada tahun 2008–2009, penulis mendapat kesempatan untuk melakukan *treatment-in-vitro* test di Laboratorium University of Massachusetts–Amherst (UMass-Amherst) USA dalam rangka penelitian disertasi.

Beberapa hasil penelitian kanker yang telah dipublikasi baik di International Journal maupun di Jurnal Nasional yang dibiayai oleh Hibah Penelitian Doktor, Hibah Program Pascasarjana dan *Sandwich Like Program* oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, antara lain: “Induksi Polifenol Mahkota Dewa dan Apoptosis Sel Kanker Paru Mencit Strain Balb/C: Analisis pada *Up-Regulation* Bax dan *Down-Regulation* Bcl-

2. Med. Med. Indo. Volume 46, Nomor 1, Tahun 2012: 33-43"; "Pengaruh Polifenol Mahkota Dewa Terhadap Proliferasi Sel dan Apoptosis pada Mencit Strain Balb/C yang Diinduksi Benzo(a) Pyrene (BaP). Med. Med. Indo. Volume 47, Nomor 1, Tahun 2013: 44-55; "Polyphenol Compounds of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl) Up-regulated Caspase-3 and Apoptosis Index in Balb/c Strain Mice. *Functional Food in Health and Disease* 2016; 6(4): 206-218".

Kegiatan penulis saat ini selain melakukan penelitian yang berhubungan dengan kanker dan penyakit degenerative lain, penulis juga mengampuh beberapa mata kuliah antara lain Biologi Sel, Biologi Molekuler, Biokimia, Biomedik dan Bioinformatika Pada Program Studi Pendidikan Biologi, Program Studi Pendidikan Dokter FK Universitas Pattimura, Konsentrasi Epidemiologi Program Studi Kesehatan Masyarakat Universitas Kristen Indonesia Maluku dan Jurusan Keperawatan dan Kebidanan Pada STIKES Kemenkes Ambon dan PASAPUA Ambon Provinsi Maluku.



Dr. dr. Indranila KS, Sp.PK(K)

Staf pengajar pada Program Studi Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Lahir di Semarang pada tanggal 12 Mei 1957. Gelar kesarjanaan (dokter) diperoleh pada tahun 1987 dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, gelar Keahlian Patologi Klinik diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tahun 2001, memperoleh Keahlian Konsultan Nefrologi pada tahun 2006, dan Gelar Doktor diperoleh dari DIKK FK Universitas Diponegoro pada tahun 2012.

Mengikuti berbagai kursus Imunologi dan Biologi Molekuler di FK UGM dalam rangka pendidikan kedokteran berkelanjutan.

Diterima dan menjadi staf pengajar pada Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tahun 1987 dengan mengajar di Bagian Patologi Klinik mata kuliah ginjal-saluran kemih, anemia, endokrin metabolik, hepatoenterologi, hematologi rutin, metodologi penelitian, aspek laboratorium pada lansia. Penelitian yang pernah dilakukan antara lain "Batu Saluran Kemih Pengabdian Berbasis Riset" (2014) dan "Serum sdLDL Level as a Diagnostic Marker of Coronary Stenosis" (2015). "Correlation between Leukosituria, Bacteriuria and Glucosuria in Diabetes Mellitus Patients(2016), menulis buku Tes Faal Hati (2017).

Mengemban tugas sebagai Kepala Himpunan Kimia Klinik cabang Semarang pada tahun 2006 sampai sekarang dan pernah menjadi Koordinator Pendidikan hingga beberapa periode. Pengurus anggota pada PDS Patklin, dan PPDS-1 dan PPDS-2 PK FK Undip sampai sekarang. Pengurus anggota pada PHTDI, Patelki dan ILKI cabang Semarang.

Menjadi dosen penanggung jawab lapangan (DPL) KKN Tim I dan Tim II Universitas Diponegoro Semarang sejak 2016 sampai sekarang dan melaksanakan Pengabdian Masyarakat serta penyuluhan pada Tim Kebencanaan Fakultas Kedokteran Undip di Gulon Magelang.