

Research Report

Efek ekstrak buah delima (*Punica Granatum L*) terhadap ekspresi *wild p53* pada sel ganas rongga mulut mencit strain swiss webster

*(The pomegranate extracts (*Punica Granatum L*) effect on the wild p53 expression in oral mouth malignant cell of swiss webster strain mice)*

Sri Hernawati,¹ Fedik Abdul Rantam,² I Ketut Sudiana³ dan Retno Pudji Rahayu⁴

¹Bagian Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Jember-Indonesia

²Departemen Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya - Indonesia

³Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

⁴Departemen Patologi Mulut dan Maksilofasial, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background: Squamous cell carcinoma is the most common cancer in the oral cavity. DNA tests showed that almost 90% of cases revealed wild p53 gene mutations. Wild p53 gene mutations cause p53 inactivation so the cell cycle does not stop in G1 phase but continues to S phase and G2 and M, it makes the mutated DNA remains multiplied and apoptosis does not occur. One candidate of the cancer treatment alternatives is pomegranate extract (*Punica granatum L* – PGL). **Purpose:** The purpose of study was to examine the effect of PGL on wild p53 expression in oral cavity malignant cell of swiss webster strain mice. **Methods:** Thirty-two swiss webster strain mice (Balb/c) 5 months old were randomly divided into four groups. Two control groups (K0: no benzopirene exposed and untreated; K1: benzopirene exposed and untreated); and 2 treatment groups (P1: benzopirene exposed and given EA; P2: benzopirene exposed and given PGL extract). The expression of wild p53 was determined by immunohistochemical techniques. **Results:** The results showed that administration of PGL could increase the expression of wild p53 in malignant epithelial cells in the oral mucosa of mice, and the expression was higher than EA. **Conclusion:** This study suggested that the PGL extract could express wild p53 in the oral cavity malignant cells of swiss Webster strains mice.

Key words: *Punica Granatum L* (PGL), ellagic acid, malignant cells, wild p53

ABSTRAK

Latar belakang: Karsinoma sel skuamosa merupakan kanker yang sering terjadi pada rongga mulut. Pemeriksaan DNA menunjukkan hampir 90% kasus dijumpai adanya mutasi gen wild p53. Mutasi gen wild p53 menyebabkan inaktivasi wild p53 sehingga siklus sel tidak berhenti pada fase G1 tetapi berlanjut ke fase S dan G2 dan M, sehingga DNA yang mengalami mutasi tetap dilipatgandakan dan apoptosis tidak terjadi. Salah satu kandidat obat kanker adalah ekstrak buah delima (*Punica Granatum L* - PGL). **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek ekstrak PGL terhadap ekspresi wild p53 pada sel ganas rongga mulut mencit strain swiss webster. **Metode:** Tiga puluh dua ekor mencit (Balb/c) strain swiss webster jantan berumur 5 bulan dibagi secara random menjadi 4 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol (K0: tidak dipapar benzopirene dan tidak diberi perlakuan; K1: dipapar benzopirene dan tidak diberi perlakuan); serta 2 kelompok perlakuan (P1: dipapar benzopirene dan diberi EA; P2: dipapar benzopirene dan diberi ekstrak PGL). Pemeriksaan ekspresi wild p53 dilakukan dengan teknik imunohistokimia. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak PGL dapat meningkatkan ekspresi wild p53 pada sel epitel ganas pada mukosa rongga mulut mencit, dan lebih

tinggi dibanding dengan pemberian EA. **Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak PGL dapat meningkatkan ekspresi wild p53 pada sel ganas rongga mulut mencit strain swiss webster

Kata kunci: *Punica Granatum L* (PGL), ellagic acid, sel ganas, wild p53

Korespondensi (*correspondence*): Sri Hernawati, Bagian Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121, Indonesia. E-mail: srihernawati.drg5@yahoo.com

PENDAHULUAN

Angka kejadian karsinoma sel skuamosa rongga mulut menempati urutan ke enam di dunia, di India dilaporkan setiap tahun 75.000-80.000 kasus baru, di Singapura dan berbagai negara Asia lainnya juga dilaporkan tinggi angka kejadiannya.^{1,2} Beberapa penelitian di Asia Tenggara, diketahui bahwa mukosa bukal merupakan daerah karsinoma sel skuamosa yang paling umum yaitu sebesar 50-72%.² Penanganan yang kurang optimal menyebabkan karsinoma sel skuamosa rongga mulut bermetastasis. Hal ini menyebabkan 30-65% penderita meninggal dunia dalam kurun waktu 5 tahun. Pemeriksaan DNA kasus karsinoma sel skuamosa rongga mulut menunjukkan hampir 90% kasus dijumpai adanya mutasi gen *wild p53*.³ Mutasi gen menyebabkan inaktivasi *wild p53* sehingga siklus sel tidak berhenti pada fase G1 tetapi berlanjut ke fase S, G2 dan M. Pada proses apoptosis *wild p53* berperan memicu faktor transkripsi p21 dan memicu aktivasi protein Bax (protooncogene yang bersifat pro-apoptosis), menekan protein Bcl-2 (protooncogene yang bersifat inhibitor apoptosis). *Wild p53* yang mengalami mutasi tidak dapat menginduksi apoptosis.⁴

Apoptosis fisiologis merupakan proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan dan berperan penting menjaga homeostatis. Apoptosis patologis adalah membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan termasuk sel ganas. Apoptosis patologis merupakan mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan berbahaya. Pada sel ganas, apoptosis ini mengalami gangguan maupun hambatan.⁵

Wild p53 merupakan tumor supresor gen yang akan mengaktifasi pembentukan p-21. Peningkatan p-21 yang disintesisakan menekan semua *cyclin dependent protein kinase* (CDK). Terjadinya siklus pembelahan sel sangat tergantung pada ikatan kompleks antara CDK dengan *cyclin*.⁵ Dengan terjadinya penekanan semua CDK, maka siklus sel akan berhenti. Saat berhenti, *wild p53* akan memicu aktivitas protein Bax, dimana protein Bax akan menekan gen Bcl-2 (protein yang berperan sebagai anti apoptosis) pada membrane mitokondria, sehingga terjadi perubahan permeabilitas membrane mitokondria, kemudian terjadi pelepasan *cytokrom-c* kesitosol. *Cytokrom-c* akan mengaktifasi Apaf-1. Apaf-1 mengaktifasi kaskade-kaspase, dan kaspase yang aktif akan mengaktifasi DNA-se sehingga terjadi apoptosis.⁶

Berbagai upaya penatalaksanaan penyakit kanker masih banyak menemui kendala, yang mengakibatkan kurangnya

keberhasilan dalam mencegah dan mengobati keganasan. Salah satu upaya pengobatan yang sudah dirintis sejak zaman dulu adalah pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat. Salah satu tanaman obat adalah buah delima (*Punica Granatum L* - PGL). Kelompok utama fitokimia buah delima adalah *polyphenol*, *polyphenol* buah delima terdiri dari *flavonoids* (*flavonols*, *flavonols* dan *anthocyanins*), *hydrolyzable tannins* (*ellagitannins* dan *gallotannins*) dan *condensed tannins* (*proanthocyanidins*). Buah delima memiliki khasiat terapeutik antara lain; anti bakteri, anti virus, anti kanker, anti inflamasi.^{6,7} *Whole* ekstrak buah delima (PGL) dengan standarisasi 40% *ellagic acid* (EA) dapat menghambat perkembangan sel kanker, anti proliferasi, menginduksi apoptosis dan anti oksidan secara invitro.^{7,8} Ekstrak buah delima dapat meningkatkan *wild p53* secara *in vitro* pada biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia dengan dosis 250 ug/ml.⁹ Standarisasi 40% EA dengan tujuan 40% dapat menggambarkan kekuatan delima yang bertanggung jawab terhadap aktivitas farmakologi.¹⁰

Ellagic acid merupakan salah satu bahan aktif dari *whole* ekstrak buah delima (PGL) berada dalam buah delima dalam bentuk bebas sebagai *ellagic acid-glycosides* atau terikat dalam bentuk *ellagitannins*.¹¹ *Ellagic acid* secara *in vitro* berfungsi sebagai anti kanker tapi masih jarang diteliti secara *in vivo*. Aktivitas dan konsentrasi EA dalam plasma rendah disebabkan kelarutan dalam air rendah, disamping itu EA mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum diabsorpsi.^{12,13} *Whole* ekstrak buah delima (PGL) mempunyai beberapa bahan aktif yang kemungkinan bekerja sinergis, diantaranya *polyphenol* dalam buah delima dapat meningkatkan kelarutan dan absorpsi EA sehingga *whole* ekstrak buah delima (PGL) mempunyai efek anti kanker yang lebih poten.^{14,15} Apabila efek *whole* ekstrak buah delima (PGL) pada mencit *Strain Swiss Webster* (Balb/c) dapat terungkap, maka *whole* ekstrak buah delima (PGL) dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif pengobatan terhadap karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek ekstrak PGL terhadap ekspresi wild p53 pada sel ganas rongga mulut mencit strain swiss webster.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Mencit yang digunakan adalah *Strain Swiss*

Webster (Balb/c), berat badan berkisar 30-50 gram, jenis kelamin jantan, berumur 5 bulan, yang diperoleh dari unit hewan coba Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Mencit dibagi 4 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol; K0 (tidak dipapar *benzopirene* dan tidak diberi perlakuan), K1 (dipapar *benzopirene* dan tidak diberi perlakuan), dan 2 kelompok perlakuan; P1 (dipapar *benzopirene* dan diberi EA), P2 (dipapar *benzopirene* dan diberi *whole* ekstrak PGL), tiap kelompok ada 8 ekor mencit. *Whole* ekstrak buah delima (PGL) adalah ekstraksi seluruh bagian buah delima dalam bentuk serbuk dan telah terstandarisasi mengandung 40% EA (produksi Xian Biof Biotechnology Co. Ltd People Republic of China). *Ellagic acid* adalah kristal putih EA merupakan salah satu komponen bahan aktif *whole* ekstrak buah delima (PGL) yang diproduksi Xian Biof Biotechnology Co. Ltd dengan *whole* ekstrak buah delima (PG).

Mencit dipapar *benzopirene* 0,04 mg/0,04 ml *olium olivarum* secara per oral seminggu 3 kali selama 4 minggu pada mukosa bukal sebelah kanan rongga mulut mencit. Pada akhir minggu ke-9 jaringan mukosa rongga mulut mencit dibiopsi, kemudian dikorbankan. Hewan model karsinoma sel skuamosa adalah mencit (Balb/c) yang telah mengalami keganasan pada epitelnya akibat paparan *benzopirene* dengan gambaran mikroskopis; menunjukkan proliferasi sel-sel epitel skuamous, sel-sel atipia disertai perubahan bentuk *rete peg processus*, pembentukan keratin yang abnormal, susunan sel tidak teratur.

Whole ekstrak buah delima (PGL), EA diberikan per oral setiap hari selama 4 minggu. Dosis *whole* ekstrak buah delima (PGL) EA adalah 75 mg/kg/bb/hari dilarutkan dalam CMC-Na 0,3 %. Pemeriksaan laboratorium yang digunakan untuk ekspresi BCL-2 dengan menggunakan Immunohistokimia. Prosedur pemeriksaan ekspresi *wild p53* meliputi: 1) persiapan reagen: tahap fiksasi. 2) pewarnaan; 3) pencucian; 4) pelebelan; dan 5) pembacaan. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia: H₂O₂ 3%, tripsin 0.025%, PBS, aquadestilata, *buffer* substrat, *xylo*, etanol absolut, metanol, air, anti *wild p53* (mouse antirat) antibodi, kaca obyek poliL-lisin, *buffer*, formalin, *labeled*, antiglobulin, sekunder, *antibody*, streptavidin.

Gambaran imunohistokimia, sel yang mengekspresikan protein *wildp53* berwarna coklat. Penghitungan sel dilakukan pada 10 lapangan pandang dengan mikroskop menggunakan pembesaran 400x dan disajikan reratanya (Gambar 1). Analisis data penelitian menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji ANOVA, uji LSD. Hasil analisis antar kelompok perlakuan menggunakan LSD.

HASIL

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia, ekspresi *wild p53* terlihat pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian *whole* ekstrak buah delima terstandar (P2/*benzopirene*+PGL) menunjukkan

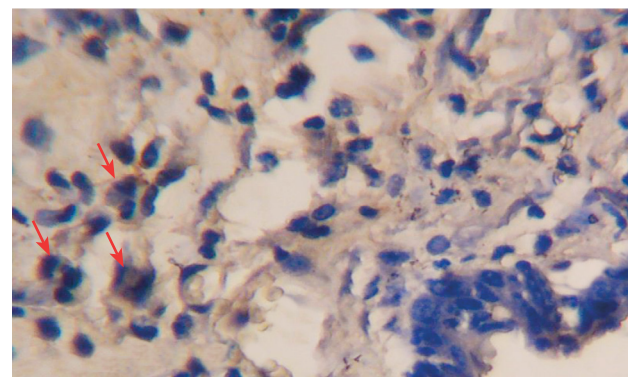
peningkatan ekspresi *wild p53* paling tinggi di bandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Kenaikan ekspresi *wild p53* pada kelompok P2 (*benzopirene* + PGL) ($0,357 \pm 0,164$) tidak berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (K0/ mencit normal) ($0,383 \pm 0,194$) dan P1 (*benzopirene* + EA) ($0,333 \pm 0,160$). Kelompok P2, P1 dan K0 berbeda secara signifikan dengan kelompok K1 ($0,133 \pm 0,216$).

PEMBAHASAN

Wild p53 merupakan protein kelompok tumor *suppressor gene* yaitu suatu protein yang berperan sebagai faktor pengendalian pertumbuhan sel, bekerja didalam inti sel, khususnya pada proses pengendalian siklus pembelahan sel. *Wild p53* merupakan faktor transkripsi terhadap pembentukan p21, peningkatan p21 yang disintesis akan menekan semua CDK, terjadinya siklus pembelahan sel sangat tergantung pada CDK. CDK ditekan dan tidak berfungsi sehingga siklus pembelahan sel akan berhenti. *Wild p53* akan memicu aktivitas Bax (pro apoptosis), aktivitas Bax akan menekan BCL (antiapoptosis), sehingga terjadi pelepasan *cytochrome-c*, mengaktifkan Apaf-1 selanjutnya mengaktifkan kaskade-kaspase. Kaspase yang aktif mengaktifkan DNA-se, DNA-se menembus membran inti dan merusak DNA yang mutasi sehingga DNA sel yang bersangkutan rusak (*fragmentasi*) dan akhirnya sel mengalami kematian (apoptosis).¹¹

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi sel yang mengekspresikan *wild p53*

Kelompok (n=6)	Jumlah sel yang mengekspresikan <i>wild p53</i> (rerata ± SD)
Kontrol (-)/K0	0,383 ± 0,194 ^a
Kontrol (+)/K1 (<i>benzopirene</i> + CMC)	0,133 ± 0,216 ^c
P1/(<i>benzopirene</i> + EA)	0,333 ± 0,160 ^{ab}
P2/(<i>benzopirene</i> +PGL)	0,357 ± 0,164 ^{ab}



Gambar 1. Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia, sel mengekspresikan *wild p53* (berwarna coklat) dengan pembesaran 400x.

Wild p53 memiliki paruh umur yang sangat singkat (4 sampai 5 menit) sedangkan bentuk *p53* mutan dari protein ini lebih stabil, dengan paruh umur 6 jam. Gen *p53* diketahui bermutasi pada sekitar 70% kejadian kanker.¹² Pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut, pemeriksaan DNA menunjukkan mutasi *wild p53*, dijumpai hingga 90% kasus.³ Mutasi *wild p53* sebagai *pointmutation*, menghasilkan protein dengan struktur berubah yang mengisolasi protein *wild p53*, sehingga menginaktivasi aktivitas fungsi *wild p53*.¹²

Ellagic acid dapat meningkatkan ekspresi reseptor kematian (apoptosis), antara lain peningkatan reseptor TRAIL R2/DR2. Ekspresi DR5 diatur oleh *wild p53* sehingga bisa dihubungkan dengan *wild p53*, peningkatan *wild p53* akan meningkatkan reseptor DR5. DR5 mengikat stimulasi kematian dan menyebabkan aktivasi *pro-caspase 8*.¹³ *Ellagic acid* dapat menginduksi pada G0/G1 melalui peningkatan level *wild p53* dan aktivasi *caspase-3* dalam sel T24 kanker *bladder*, melalui pemeriksaan *flowcytometry* dan PCR (*poly chain reaction*).¹⁴ *Ellagic acid* telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan dapat mencegah destruksi gen *p53* oleh kanker. Selain itu *ellagic acid* juga dapat berikatan dengan sel kanker dan membentuk suatu molekul kompleks, sehingga sel kanker menjadi inaktif.¹⁵

Whole ekstrak buah delima (PGL) terstandar lebih kuat efeknya terhadap peningkatan ekspresi *wild p53* dibandingkan EA, hal ini membuktikan *whole* ekstrak buah delima (PGL) lebih efektif untuk meningkatkan *wild p53*. Penelitian ini menginformasikan bahwa *whole* ekstrak buah delima (PGL) yang mengandung beberapa bahan aktif, memiliki efek unggul dan bekerja secara sinergis. Empat kandungan bahan aktif dari buah delima (PGL), yaitu EA, *caffeic acid*, *luteolin*, *punicid acid* secara individual menunjukkan aktivitas antikanker pada sel kanker prostat. Namun bila dikombinasikan, keempatnya menunjukkan aktivitas yang berlipat ganda⁸ dibanding EA lebih rendah karena EA mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum diabsorpsi, kelarutannya rendah dalam air, metabolisme EA tidak larut dalam intestinal.¹¹ Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak PGL dapat mengekspresi *wild p53* pada sel ganas rongga mulut mencit strain swiss webster

DAFTAR PUSTAKA

1. Epstein W. Oral cancer. Textbook of oral medicine. Burket Eleventh Edition. Hamilton: BC Decker Inc Press; 2008 .p. 153-67.
2. Solomon MC, Carnelio S, Gudattu V. Molecular analysis of oral squamous cell carcinoma: A tissue microarray study. Kamataka India: Department of Oral Pathology, Manipal College of Dental Science, Manipal University Manipal; 2010. p. 104-576.
3. Safriadi M. Patologi mulut tumor neoplastik dan nonneoplastik rongga mulut. Yogyakarta: CV Andi; 2008. p. 73-83.
4. Sudiana IK. Patobiologi molekuler kanker. Jakarta: Penerbit Salemba Medika; 2008. p. 27-90.
5. Salido GM, Rosado JA. Apoptosis; involvement of oxidative stress and intracellular Ca²⁺ homeostasis Spain. Dept of Physiology University of Ektremadure; 2009. p. 35-229.
6. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 2007; 109(2): 177-206.
7. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L*): a review. Altern Med Rev 2008; 13(2): 128-44.
8. Seeram NP, Schulman RN, Heber D. Pomegranate ancient roots to modern medicine. 1st ed. New York: Taylor and Francis Group; 2006. p. 2-99.
9. Kholifa M. Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum Linn*) terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia Sp-C1 in vitro. Biomedika 2010; 2(2): 72-80.
10. Saifudin A, Rahayu V, Teruna HY. Textbook standardisasi bahan obat alam. Edisi pertama. Yogyakarta: Press Universitas Gajah Mada 2011; 1(1): 1-26.
11. Kresno SB. Textbook Ilmu dasar onkologi. Edisi kedua. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2011. h. 66-129.
12. William. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. J Clin Oral Pathology Birmingham Dental Hospital and School; 53: 72-165.
13. Mohammad HF. Ellagic acid mediated CK2 inhibition. A natural multifunction strategy to trigger cervical cancer cell death invitro and in vivo. Dissertation. Department of Chemistry, Cleve Land State University; 2002. p. 1-24.
14. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 2007; 109(2): 128-44.
15. Seeram NP, Adam LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptosis and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenol as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem 2005; 16(6): 360-7.