

DISERTASI

**AKTIVITAS ANTI-TUMOR SENYAWA *Brucein D* DARI
EKSTRAK BUAH *Brucea javanica* PADA SEL KANKER
KANDUNG KEMIH T24 MELALUI INDUKSI EKSPRESI GEN
PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, dan p53, SERTA HAMBATAN
GEN ANTI-APOPTOSIS Bcl-2**

**ANTI-TUMOR ACTIVITY of *Brucein D* COMPOUND FROM
Brucea Javanica FRUIT EXTRACT ON T24 BLADDER
CANCER CELL LINE by INDUCTION OF PRO-APOPTOSIS
Bax, Bak, and p53, GENE EXPRESSION AND INHIBITION
OF ANTI-APOPTOSIS Bcl-2 GENE EXPRESSION**



PANDU ISHAQ NANDANA

C013181008

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

AKTIVITAS ANTI-TUMOR SENYAWA *Brucein D* DARI EKSTRAK BUAH *Brucea javanica* PADA SEL KANKER KANDUNG KEMIH T24 MELALUI INDUKSI EKSPRESI GEN PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, dan p53, SERTA HAMBATAN GEN ANTI-APOPTOSIS Bcl-2


ANTI-TUMOR ACTIVITY of *Brucein D* COMPOUND FROM *Brucea Javanica* FRUIT EXTRACT ON T24 BLADDER CANCER CELL LINE by INDUCTION OF PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, and p53, GENE EXPRESSION AND INHIBITION OF ANTI-APOPTOSIS Bcl-2 GENE EXPRESSION

Disusun dan diajukan
Oleh


Pandu Ishaq Nandana
C013181008

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 8 Juni 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui
Promotor,


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM, Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001

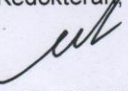
Co. Promotor


Dr. dr. Prihantono, Sp. B.Onk(K), M.Kes
Nip. 19740629 200812 1 001


Co. Promotor


Dr. dr. Ika Yustisa, S.Ked, M.Sc
Nip. 19770121 200312 2 003

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001

ABSTRAK

PANDU ISHAQ NANDANA. *Aktivitas Anti-Tumor Senyawa Brucein D. Dari Ekstrak Buah Brucea Javanica pada Sel Kanker Kandung Kemih T-24 Melalui Induksi Ekspresi Gen Pro-Apoptosis Bax, Bak, dan P-53, serta Hambatan Gen Anti-Apoptosis Bcl-2* (dibimbing oleh Haerani Rasyid, Prihantono, dan Ika Yustisia).

Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antikanker senyawa *Brucein D.* terhadap sel kanker kandung kemih T-24 yang berkaitan dengan gen-gen terkait apoptosis. Metode: Sitotoksitas *Brucein D.* dievaluasi menggunakan MTT assay, dilanjutkan dengan pewarnaan *fluoresens Calcein-AM/PI*, dan pewarnaan inti sel *Hoechst-33342* untuk menentukan morfologi apoptosis, serta pemeriksaan fragmentasi DNA dan analisis PCR semikuantitatif untuk pemeriksaan gen terkait apoptosis Bax, Bak, P-53, dan Bcl-2. Analisis aktivitas biologis, aktivitas farmakologis, mekanisme aksi, dan visualisasi *ligand Brucein D.* dilakukan menggunakan analisis tambatan molekuler (*study in silico*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Brucein D.* mempunyai sitotoksitas yang tinggi terhadap sel T-24 dengan IC₅₀ 0,6457 µg/mL, namun relatif nontoksik pada sel fibroblast normal 1-BR-3 dibandingkan obat kemoterapi. Hasil analisis viabilitas menunjukkan bahwa *Brucein D.* meningkatkan jumlah kematian sel secara signifikan dibandingkan kontrol sesuai dengan peningkatan dosis, dan *Brucein D.* dosis IC₅₀ secara signifikan juga meningkatkan persentase sel apoptosis dibandingkan kontrol, yaitu 56,04±3,09%, berbanding 9,42±2,88%. Hasil ini secara signifikan sama dengan *doxorubicin* IC₅₀ (58,97±12,31), namun lebih rendah dibandingkan *docetaxcel* IC₅₀ (74,42±9,79). Pemberian *Brucein D.* pada sel T-24 menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA pada pemeriksaan agarose gel, dan pemeriksaan ekspresi gen terkait apoptosis menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen proapoptosis (Bax, Bak, dan P-53), serta penurunan ekspresi gen antiapoptosis (Bcl-2) yang menunjukkan adanya induksi T-24 setelah diberikan perlakuan dengan *Brucein D.*.

Kata kunci: *Brucein D.*, T-24 bladder cancer cell line, *Brucea javanica*, apoptosis



ABSTRACT

PANDU ISHAQ NANDANA. *Anti-Tumor Activity of Brucein D Compound from Brucea Javanica Fruit Extract on T24 Bladder Cancer Cell Line by Induction of Pro-Apoptosis Bax, Bak, and P53, Gene Expression, and Inhibition of Anti-Apoptosis Bcl-2 Gene Expression* (supervised by Haerani Rasyid, Prihantono, and Ika Yustisia)

This study aims to determine the anticancer activity of Brucein D towards T24 bladder cancer cells. The cytotoxicity of Brucein D towards the T24 bladder cancer cell line through the induction of apoptosis *in vitro* and docking *in silico* was investigated. Cytotoxic activity of Brucein D was evaluated with MTT assay, followed by Calcein-AM/PI and Hoechst 33342 nuclear staining for apoptotic cell morphology. DNA fragmentation and semi-quantitative PCR analysis were used to evaluate the apoptotic-related gene expression, Bax, Bak, Bcl2, and p53. Analysis of biological activity, pharmacological effects, mechanism of action, and visualization was conducted by molecular docking study.

The results show that Brucein D has a high toxicity towards T24 bladder cancer cells with an IC₅₀ value of 0.6457 µg/mL, but non-toxic is relatively less to 1BR3 normal skin fibroblast cells compared to the chemotherapy drugs. The viability assay shows that Brucein D significantly increases the percentage of dead cells compared to control in a dose-dependent manner. Furthermore, the percentage of apoptotic cells treated with Brucein D IC₅₀ (56.04±3.09 %) is significantly higher than control (9.42±2.88) and similar to Doxorubicin IC₅₀ (58.97±12.31), but it is lower than Docetaxcel IC₅₀ (74.42±9.79). As one of the key signs of apoptosis, DNA fragmentation in gel electrophoresis is also observed in T24 bladder cancer cells treated with Brucein D. Apoptosis is also confirmed by upregulation of pro-apoptosis genes (Bax, Bak, p53), and downregulation of anti-apoptosis gene (Bcl2), that confirms the induction of apoptosis in the intrinsic pathway by Brucein D.

Keywords: Brucein D, T24 bladder cancer cell line, Brucea javanica, apoptosis





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, 585836, 586200 Psw. 2767 Fax. (0411) 586297

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Pandu Ishaq Nandana**
Nomor Pokok : C013181008
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul : **Aktivitas Anti-Tumor Senyawa Brucein D Dari Ekstrak Buah *Brucea javanica* Pada Sel Kanker Kandung Kemih T24 Melalui Induksi Ekspresi Gen Pro-Apoptosis Bax, Bak, dan p53, Serta Hambatan Gen Anti-Apoptosis Bcl-2**

Adalah karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar- benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Januari 2023

Yang menyatakan,



Pandu Ishaq Nandana

**AKTIVITAS ANTI-TUMOR SENYAWA *Brucein D* DARI
EKSTRAK BUAH *Brucea javanica* PADA SEL KANKER
KANDUNG KEMIH T24 MELALUI INDUKSI EKSPRESI GEN
PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, dan p53, SERTA HAMBATAN
GEN ANTI-APOPTOSIS Bcl-2**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Mencapai Gelar Doktor

Program Studi Kedokteran

Disusun dan Diajukan oleh

**PANDU ISHAQ NANDANA
C013181008**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

AKTIVITAS ANTI-TUMOR SENYAWA *Brucein-D* DARI EKSTRAK BUAH *Brucea javanica* PADA SEL KANKER KANDUNG KEMIH T24 MELALUI INDUKSI EKSPRESI GEN PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, dan P53 SERTA HAMBATAN GEN ANTI-APOPTOSIS Bcl-2

ANTI-TUMOR ACTIVITY of *Brucein D* COMPOUND FROM *Brucea Javanica* FRUIT EXTRACT ON T24 BLADDER CANCER CELL LINE by INDUCTION OF PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, and p53, GENE EXPRESSION AND INHIBITION OF ANTI-APOPTOSIS Bcl-2 GENE EXPRESSION

Diajukan oleh :

Pandu Ishaq Nandana
C013181008

Telah dipertahankan dalam Ujian Disertasi Doktor pada :

8 Juni 2023

Menyetujui
Promotor

Prof. Dr. dr. Haerani Rasvid, M.Kes, Sp.PD, Sp.GK(K)
Nip. 19680530 199603 2 001

Co-Promotor

Co-Promotor

Dr. dr. Prihantono, SpB.Onk(K)
Nip. 19740629 200812 1 001

Dr. dr. Ika Yustisia, S.Ked, M.Sc
Nip. 19770121 200312 2 003

Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran

Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip. 19671103 199802 1 001

DAFTAR TIM PENGUJI

1. Promotor : Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, MKes, SpPD, SpGK(K)
2. Ko-Promotor : Dr. dr. Prihantono, SpB.Onk(K)
3. Ko-Promotor : Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc
4. Penguji eksternal: dr. Lukman Hakim, SpU(K) , Ph.D
5. Penguji : Prof. Subehan, S.Si, M.Pharm, Ph.D, Apt
6. Penguji : dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D
7. Penguji : Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
8. Penguji : dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, SpGK(K)
9. Penguji : Dr. dr. Rina Masadah, M.Phil, SpPA(K)

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Pandu Ishaq Nandana

NIM : C013181008

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa disertasi saya yang berjudul **AKTIVITAS ANTI-TUMOR SENYAWA *Brucein-D* DARI EKSTRAK BUAH *Brucea javanica* PADA SEL KANKER KANDUNG KEMIH T24 MELALUI INDUKSI EKSPRESI GEN PRO-APOPTOSIS Bax, Bak, dan P53 SERTA HAMBATAN GEN ANTI-APOPTOSIS Bcl-2** benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 11 September 2022

Yang Menyatakan,

Pandu Ishaq Nandana

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji dan syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya yang telah dilimpahkan serta memberikan saya kekuatan sehingga dapat menyelesaikan disertasi ini. Tidak lupa shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW, keluarga, para sahabat dan para pengikutnya hingga akhir zaman.

Pengalaman dan kendala sangat berharga yang diperoleh penulis selama penyusunan skripsi ini, namun dengan bantuan berbagai pihak, Alhamdulillah penelitian yang menghasilkan disertasi ini dapat diselesaikan.

Dengan segala hormat dan doa kepada kedua orang tua saya dr. Santyowibowo, SpB dan dr. Siti Farida, SpM(K) atas doa dan pengorbanannya untuk membimbing saya menjadi diri saya yang sekarang.

Pada kesempatan ini dengan rasa hormat yang tulus, izinkan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada : Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc sebagai Rektor Universitas Hasanuddin, Dr.dr. Irfan Idris, M.Kes selaku Ketua Program Studi Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin saat ini dan dr Agussalim Buchari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) selaku Ketua Program Studi Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin sebelumnya. Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes,

Sp.PD, K-GH, FINASIM, Sp.GK selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin saat ini sekaligus sebagai Promotor dan Prof. dr. Budu, Sp.M(K) Ph.D, M.Med.Ed. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya.

Terima kasih pula, saya ucapkan kepada Dr. dr. Prihantono, Sp.B, SubSp. Onk.(K), M.,Ked dan Dr. dr. Ika Yustisia, S.Ked. M.Sc sebagai ko-promotor yang selalu bersedia membantu di tengah kesibukan yang sangat padat, dengan sabar membimbing saya dari awal sampai selesainya disertasi ini. Tim Penguji dr. Agussalim Buchari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K), Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes, Prof. Subehan, S.Si, M.Pharm.Sc, Ph.D, Apt, dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D, Dr. dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phill, DFM, dan dr. Lukman Hakim, SpU(K), PhD, selaku penguji yang sangat kompeten dibidangnya, yang telah memberikan saran, masukan untuk penyempurnaan disertasi ini.

Pada kesempatan ini juga, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada staf Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran atas pengertian, dukungan, dan semangat yang telah diberikan dalam menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada Eka Sunarwidhi Prasedya, S.Si, M.Sc, Ph.D sebagai kepala Laboratorium Pusat Unggulan Biosains dan Bioteknologi Universitas Mataram beserta staf yang telah membantu saya dalam pelaksanaan penelitian biomolekuler dalam menyelesaikan disertasi ini.

Secara khusus saya ucapkan terima kasih atas dukungan dan semangatnya selama ini, istriku tercinta dr. Marie Yuni Andari, SpM sertaputra dan putri saya Yudhistira Rienanda dan Nadya Larasati atas doa yang tak henti-hentinya, dukungan, pengertian, dan kesabaran dari awal hingga akhir diselesaikannya disertasi ini.

Kepada nama-nama yang tidak dapat dituliskan satu persatu, yang telah membantu dan mendukung dalam penyelesaian disertasi ini, saya ucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya. Saya menyadari terdapat kekurangan dan keterbatasan selama proses penelitian dan penyusunan disertasi ini, oleh karena itu dengan rendah hati saya sampaikan penyesalan saya. Kiranya hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dan penerapannya bagi Masyarakat. Semoga Allah memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada saya untuk semua pihak yang telah membantu dan mendukung hingga penyelesaian disertasi ini.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Makassar, 27 Mei 2023

Pandu Ishaq Nandana

ABSTRAK

Brucein D, senyawa quassinoid yang diisolasi dari buah *Brucea javanica* dilaporkan memiliki aktivitas anti kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas anti kanker senyawa Brucein D terhadap sel kanker kandung kemih T24 melalui perubahan ekspresi gen terkait apoptosis. Penelitian ini mempelajari sitotoksitas Brucein D terhadap sel kanker kandung kemih T24 melalui induksi apoptosis secara *in vitro* dan *in silico*. Sitotoksitas Brucein D dievaluasi menggunakan MTT (3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), dilanjutkan dengan pewarnaan fluoresens untuk viabilitas sel menggunakan Calcein-AM/PI. Morfologi apoptosis ditentukan menggunakan pewarnaan inti sel Hoechst33342 dan pemeriksaan fragmentasi DNA. Untuk kontrol positif digunakan obat kemoterapi doxorubicin dan docetaxel. Pemeriksaan gen terkait apoptosis Bax, Bak, p53, dan Bcl-2 dilakukan menggunakan analisis PCR semikuantitatif. Analisis aktivitas biologis, aktivitas farmakologis, dan mekanisme aksi ligand Brucein D dilakukan menggunakan PASS Online Prediction, sedangkan analisis tambatan molekuler / *molecular docking* dan visualisasi kompleks ligand-protein dilakukan menggunakan PyRx v0.8, DS BIOVIA Discovery Studio 2016 v16.10.0, dan PyMol v2.4. Hasil studi ini menunjukkan bahwa Brucein D mempunyai sitotoksitas yang tinggi terhadap sel T24 dengan IC_{50} 0.6457 μ g/mL namun relatif non-toksik pada sel fibroblast normal 1BR3 dibandingkan obat kemoterapi. Analisis viabilitas menunjukkan bahwa Brucein D meningkatkan jumlah kematian sel secara signifikan dibanding kontrol sesuai dengan peningkatan dosis, dan pada dosis IC_{50} , Brucein D secara signifikan meningkatkan persentase jumlah sel apoptosis dibandingkan kontrol 56.04 \pm 3.09 % berbanding 9.42 \pm 2.88 %, sama dengan doxorubicin IC_{50} (58.97 \pm 12.31) namun lebih rendah bila dibandingkan docetaxel IC_{50} (74.42 \pm 9.79). Brucein D juga menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA sel T24 pada pemeriksaan agarose gel, dan pada pemeriksaan ekspresi gen terkait apoptosis, pemberian Brucein D menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen pro-apoptosis (Bax, Bak, dan p53) serta penurunan ekspresi gen anti-apoptosis (Bcl-2). Studi tambatan molekuler menunjukkan bahwa Brucein D mampu melewati membran sel tanpa efek toksik, Brucein D mempunyai kemampuan anti-neoplastik dengan Pa value yang lebih tinggi dari Pi value, dan mempunyai energi ikatan pada protein Bcl-2 sebesar -8.3 kcal/mol, yang

artinya setara dengan doxorubicin dan docetaxel (-9.0 kcal/mol). Visualisasi tambatan molekuler menunjukkan bahwa Brucein D menghasilkan 6 tipe ikatan yang kuat dan stabil dengan protein Bcl-2. Sebagai kesimpulan, Brucein D menunjukkan efek sitotoksik dan apoptosis terhadap sel kanker kandung kemih T24 sehingga dapat dipergunakan sebagai kandidat bahan obat tradisional yang menjanjikan sebagai anti kanker melalui induksi apoptosis pada jalur intrinsik dan dengan toksisitas rendah pada sel normal

Keywords: Apoptosis, Brucea javanica, Brucein D, T24 bladder cancer cell line

ABSTRACT

Brucein D, a quassinoid isolated from *Brucea javanica* fruit, has been reported to exhibit anticancer activity. The aim of this study is to determine the anticancer activity of Brucein D against T24 bladder cancer cell by alteration of apoptosis related genes. We investigated the cytotoxicity of Brucein D against the T24 bladder cancer cell line through the induction of apoptosis *in vitro* and docking *in silico*. Cytotoxic activity of Brucein D was evaluated with MTT (3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium), followed by Calcein-AM/PI viability staining. Apoptotic activity was determined with Hoechst 33342 nuclear staining and DNA fragmentation. Doxorubicin and docetaxel were used as positive control. Evaluation of apoptosis-related gene expression, Bax, Bak, Bcl2, and p53 was also performed using semi-quantitative PCR analysis. PASS Online Prediction was performed to analyze the ligand biological activity, pharmacological effects, and mechanism of action of Brucein D, and molecular docking study and visualization were conducted using PyRx v0.8, DS BIOVIA Discovery Studio 2016 v16.10.0, and PyMol v2.4. Current results show that Brucein D had high toxicity against T24 bladder cancer cells with an IC₅₀ value of 0.6457 μg/mL, but relatively less toxic to 1BR3 normal skin fibroblast cells compared to the chemotherapy drugs. The viability assay shows that Brucein D significantly increases the percentage of the dead cells compared to control in a dose-dependent manner. Furthermore, the percentage of apoptotic cells treated with Brucein D IC₅₀ (56.04±3.09 %) was significantly higher than control (9.42±2.88) and similar to Doxorubicin IC₅₀ (58.97±12.31), but lower than Docetaxel IC₅₀ (74.42±9.79). As one of the key signs of apoptosis, DNA fragmentation in gel electrophoresis was also observed in T24 bladder cancer cells treated with Brucein D. Apoptosis was also confirmed by alteration in the expression of apoptosis-related genes. Upregulation of pro-apoptosis genes (Bax, Bak, p53), and downregulation of anti-apoptosis gene (Bcl2) confirmed the induction of apoptosis in the intrinsic pathway by Brucein D. The molecular study shows that Brucein D can pass cell membrane with no toxicity effect, Brucein D have shown anti-neoplastic biological activity with Pa value higher than Pi value, and with binding energy -8.3 kcal/mol to Bcl2, Brucein D can be a candidate for Bcl2 inhibitor almost equal to doxorubicin and docetaxel (-9.0 kcal/mol). Molecular docking visualization shows that there are six types of bond formed by Brucein D ligand with amino acid

residue generated by Bcl2 receptor protein, which means the bonds are strong and stable.

In conclusion, Brucein D has shown a cytotoxic effect against T24 bladder cancer cell; hence it is a promising natural compound for the treatment of bladder cancer by induction of apoptosis through activation of the intrinsic pathway and with low toxicity to normal cells.

Keywords: Apoptosis, Brucea javanica, Brucein D, T24 bladder cancer cell line

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGAJUAN	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
DAFTAR TIM PENGUJI	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
1. Tujuan Umum	5
2. Tujuan Khusus	5
D. Manfaat Penelitian	6
1. Manfaat Keilmuan	6
2. Manfaat Praktis	6
E. Kebaruan (Novelty)	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Anatomi dan Histologi Kandung Kemih	7
B. Fisiologi Kandung Kemih	8

C.	Kanker Kandung Kemih	9
1.	Epidemiologi	9
2.	Diagnosis	11
3.	Klasifikasi	12
4.	Terapi Kanker Kandung Kemih	14
D.	Brucea Javanica	19
E.	Brucein D	23
F.	Siklus Sel	26
G.	Apoptosis	28
1.	Mekanisme Apoptosis	30
a.	Jalur Intrinsik	30
b.	Jalur Ekstrinsik	31
2.	Peranan Bcl-2 Family pada Apoptosis	32
3.	Induksi Apoptosis melalui p53	34
4.	Regulator Negatif pada Apoptosis	36
5.	Peranan Caspase pada Apoptosis	37
6.	Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis	38
7.	Identifikasi Apoptosis	39
H.	Kerangka Teori dan Kerangka Konsep	43
1.	Kerangka Teori	43
2.	Kerangka Konsep	60
I.	Hipotesis Penelitian	47
J.	Variabel Penelitian	48
1.	Variabel Bebas	48
2.	Variabel Terikat	49
K.	Definisi Operasional	49
III	METODE PENELITIAN	53
A.	Desain Penelitian	53
B.	Lokasi dan Waktu Penelitian	53
C.	Subyek Penelitian	54
D.	Alat dan Bahan	54

1.	Alat	54
2.	Bahan	55
3.	Software	57
E.	Tahap Penelitian	58
F.	Analisis Data	71
G.	Alur Penelitian	73
H.	Etik Penelitian	76
IV.	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	77
A.	Hasil Penelitian	77
1.	Morfologi Sel T24	77
2.	Pengukuran Sitotoksitas Brucein D pada Sel T24 dan Penentuan IC ₅₀	78
3.	Pemeriksaan Viabilitas Sel Dengan Pewarnaan Fluoresens Ganda (Calcein-AM dan PI)	81
4.	Pengaruh Brucein D pada apoptosis sel T24	84
4.1.	Pemeriksaan morfologi sel apoptosis dengan pewarnaan fluoresens Hoechst 33342	84
4.2.	Analisis Fragmentasi DNA	87
4.3.	Pemeriksaan ekspresi gen Bax, Bak, Bcl-2, dan p53	88
5.	Studi <i>in silico</i> / <i>Molecular Docking</i> Brucein D pada protein reseptor Bcl-2	90
5.1.	Hasil analisis Lipinski Rule of Five Brucein D	90
5.2.	Hasil PASS Online Prediction	92
5.3.	Hasil studi tambatan molekuler	93
B.	Pembahasan	95
1.	Sitotoksitas Brucein D pada Sel T24	95
2.	Analisis Kematian Sel dan Apoptosis Sel T24	99

3.	Anlisis Fragmentasi DNA	102
4.	Analisis Ekspresi Gen Bax, Bak, Bcl-2, p53	104
5.	Analisis Studi <i>in Silico</i>	108
C.	Keterbatasan dan Kelebihan Penelitian	109
1.	Keterbatasan Penelitian	109
2.	Kelebihan Penelitian	111
D.	Ringkasan Penelitian	112
V.	PENUTUP	115
A.	Kesimpulan	115
B.	Saran	115
	DAFTAR PUSTAKA	117
	LAMPIRAN	131

DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar		Halaman
1.	Insidensi, Mortalitas, dan Prevalensi Kanker di Indonesia	10
2.	Staging kanker kandung kemih	13
3.	Klasifikasi TNM menurut <i>American Joint Committee on Cancer (AJCC)</i>	13
4.	<i>Brucea javanica</i> / buah makassar / buah wali	20
5.	Gambaran Skematik Jalur Biokimia yang Berhubungan dengan <i>Brucea-induced</i> apoptosis	22
6.	Struktur Kimia Brucein D	24
7.	Proses Apoptosis	29
8.	Jalur Ekstrinsik dan Intrinsik Apoptosis	31
9	Mekanisme <i>p53-induced</i> Apoptosis	26
10	Gambar Morfologi sel Apoptosis dan Nekrosis	39
11	Morfologi sel T24 setelah diberikan perlakuan dengan Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel dengan konsentrasi 0.01 – 100 µg/mL dibanding kontrol	78
12	IC ₅₀ Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel terhadap sel T24	79
13	Morfologi sel 1BR3 setelah diberikan perlakuan dengan Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel dengan konsentrasi 0.01 – 100 µg/mL	80
14	Morfologi sel T24 dengan pewarnaan fluoresens calceinAM-PI, setelah diberikan perlakuan dengan Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel dengan konsentrasi 0.01 - 100 µg/mL	81

15	Grafik peningkatan jumlah angka kematian sel T24 sesuai dengan peningkatan dosis Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel	82
16	Pewarnaan Fluoresens Hoechst3342 menunjukkan kondensasi kromatin pada sel T24 yang mengalami apoptosis	85
17	Persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis.	86
18	DNA sel T24 setelah perlakuan dengan Brucein D, doxorubicin, dan docetaxel, dibandingkan kontrol	88
19	Analisis ekspresi gen berdasarkan ekspresi mRNA relatif dibandingkan gen houskeeping GAPDH	89
20	Analisis ekspresi gen terkait apoptosis dibandingkan gen hosekeeping GAPDH	90
21	Struktur Brucein D 3 Dimensi (CID : 441788)	92
22	Visualisasi molekuler ikatan Brucein D pada protein Bcl-2	95
23	Mekanisme terjadinya apoptosis pada beberapa macam sel line terhadap pemberian Brucein D	107

DAFTAR TABEL

Nomor Tabel		Halaman
Tabel 1.	Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis	38
Tabel 2.	Tabel Oneway ANOVA jenis dan dosis senyawa terhadap persentase kematian sel	83
Tabel 3.	Tabel Uji Post Hoc Tukey HSD pada setiap dosis senyawa terhadap angka kematian sel T24	83
Tabel 4,	Tabel Uji Post Hoc Tukey HSD pada semua senyawa pada dosis IC ₅₀ terhadap CTCF	85
Tabel 5.	Tabel Uji Post Hoc Tukey HSD pada persentase sel T24 yang mengalami apoptosis	87
Tabel 6.	Hasil Lipinski rule of five senyawa Brucein D	91
Tabel 6.	Hasi PASS Online Prediction	93
Tabel 7.	Hasil Studi Tambatan Molekuler	94
Tabel 8.	Sitotoksitas Brucein D pada beberapa jenis sel kanker	97

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Singkatan	Arti / Keterangan
Apaf-1	: Apoptosis protease activating factor-1
Bak	: Bcl-2-homologous antagonist killer
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BJ	: Bruceajavanica
BJOE	: Bruceajavanica oil emulsion
BTA	: Bladder Tumor Antigen
C	: Cystein
Caspase	: Cysteine aspartate-specific proteases
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
c-FLIP	: FADD-like interleukin-1- β -converting enzyme (FLICE)-like inhibitory protein
CIS	: Carcinoma in situ
CT	: Computed Tomography
DAPI	: 4,6-Diamidino-2-phenylindole
DED	: Death effector domains
DISC	: Death inducing signalling complex
DPPH	: 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl
EGCG	: Epigallocatechin-3-gallate
EVOO	: Extra-Virgin Olive Oil
FADD	: Fas associated death domain protein
FDA	: Food and Drug Administration
GLOBOCAN	: Global Burden of Cancer
GnRH	: Gonadotropin releasing hormone
HCC	: Hepatocellular carcinoma
HSC2	: Human Oral Squamous Cell Carcinoma
H2DCFDA	: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
IAP	: Inhibitor of apoptosis
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IAUI	: Ikatan Ahli Urologi Indonesia
IFN- γ	: Interferon gamma
IL-2	: Interleukin-2
ISUP	: International Society of Urological Pathology
IVU	: Intravenous Urography

KKKIO	:	Kanker Kandung Kemih Invasi Otot
KKKNIO	:	Kanker Kandung Kemih Non Invasi Otot
KST	:	Karsinoma Sel Transisional
LHRH	:	Lutenizing Hormone Releasing Hormone
LUTS	:	Lower Urinary Tract Symptoms
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	:	Myeloid cell leukemin-1
MIBC	:	Muscle Invasive Bladder Cancer
MMP	:	Mitochondrial Membrane Permeabilization
MOMP	:	Mitochondrial outer membrane permeabilisation
MRI	:	Magnetic Resonance Imaging
NCCN	:	National Comprehensive Cancer Network
NF-kB	:	Nuclear Factor Kappa activated B cell
NMIBC	:	Non Muscle Invasive Bladder Cancer
NMP	:	Nuclear Matrix Protein
NSCLC	:	Non-small-cell lung carcinomas
NTCC	:	Non-Transitional Cell Carcinoma
PCD	:	Programmed Cell Death
PDLB	:	Protein linked DNA breaks
RCC	:	Renal cell carcinoma
RCT	:	Randomized Control Trial
ROS	:	Reactive Oxygen Species
RSCM	:	Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo
RSHS	:	Rumah Sakit Hasan Sadikin
RSKD	:	Rumah Sakit Kanker Dharmais
SCC	:	Squamous Cell Carcinoma
SCLC	:	Small-cell lung cancer
SMAC	:	Second Mitochondrial derived activator of caspase
SOL	:	Space Occupying Lession
TCC	:	Transitional Cell Carcinoma
Tis	:	Tumor in situ
TNFR	:	Tumour necrosis factor receptor
TNM	:	Tumour-Nodes-Metastases
TRADD	:	TNF receptor associated death domain
TRAIL	:	TNF related apoptosis inducing ligand
USG	:	Ultrasonography
VDAC	:	Voltage dependent anion channel
WHO	:	World Health Organization
XIAP	:	X-linked inhibitor of apoptosis protein

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Etik Penelitian	130
B. Statistik	
1. Oneway ANOVA jenis dan dosis obat terhadap kematian sel	131
2. Uji Post Hoc Tukey HSD jenis dan dosis obat terhadap kematian sel	132
3. Oneway ANOVA jenis obat terhadap CTCF	133
4. Uji Post Hoc Tukey HSD jenis obat terhadap CTCF	134
5. Oneway ANOVA jenis obat terhadap apoptosis	135
6. Uji Post Hoc Tukey HSD jenis obat terhadap Apoptosis	136
C. Dokumentasi	
1. Brucein D	137
2. Sel T24	138
3. Dokumentasi penelitian	138

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker kandung kemih merupakan salah satu keganasan dengan angka kejadian terbanyak kedua dalam sistem urinarius dan angka kejadiannya terus bertambah setiap tahun. Menurut data dari GLOBOCAN tahun 2018, kanker kandung kemih menempati peringkat ke-10 dari semua jenis kanker di seluruh dunia, dengan estimasi 549.000 kasus baru (3,0%) dan 200.000 kasus kematian (2,1%). Insidensi di seluruh dunia adalah 9 per 100.000 untuk laki-laki dan 2 per 100.000 untuk perempuan (Bray, 2018). Insidensi kanker kandung kemih didominasi laki-laki dengan angka kejadian 77% berbanding perempuan, dan berada pada peringkat ke-7 sebagai keganasan terbanyak pada laki-laki, dan peringkat ke-9 untuk angka mortalitas pada laki-laki. Sedangkan pada perempuan, insidensi kanker kandung kemih berada di peringkat ke-19. Kejadian kanker kandung kemih lebih banyak pada negara industri maju seperti Amerika, Eropa, dan Asia Barat, namun angka kematiannya lebih tinggi pada negara berkembang (Cumberbatch, 2018).

Kanker kandung kemih di Indonesia menurut data dari GLOBOCAN tahun 2018 menempati peringkat ke-14 dengan jumlah kasus baru sebanyak 6.716 kasus (1,9% dari total kasus kanker) dan 3.375 kasus

kematian (1,6% dari total kematian karena kanker) (Bray, 2018). Sedangkan di RSUD Provinsi NTB, angka kejadian kasus kanker kandung kemih pada periode tahun 2017-2018 sebanyak 90 kasus dengan perbandingan laki-laki dan perempuan sebesar 2,6 : 1, dan rata rata usia di atas 50 tahun (Anugrah, 2019).

Sekitar 70 – 80% penderita kanker kandung kemih pertama kali terdiagnosa pada stadium *Non Muscle Invasive Bladder Cancer* (NMIBC), sehingga pilihan terapinya adalah reseksi tumor kandung kemih transurethra dengan angka harapan hidup 5 tahun cukup tinggi. Namun angka rekurensi kanker kandung kemih sangat tinggi, bahkan mencapai 60 - 70 % dalam 5 tahun setelah terapi inisial, dengan 25% diantaranya berkembang secara progresif dan menjadi kanker invasif (Van der Heijden, 2009, Leiblich, 2018). Salah satu cara mencegah rekurensi dan menghambat progresifitas adalah dengan melakukan kemoterapi intravesika atau terapi immunosupresif setelah TURBT, namun selain angka keberhasilannya hanya sekitar 30%, efek samping yang didapat juga banyak, seperti iritasi kandung kemih, reaksi alergi, dan supresi sumsum tulang (Witjes, 2019). Di RSUD Propinsi NTB, dalam periode 2017 – 2020, didapatkan 27 pasien yang menjalani kemoterapi intravesika setelah sebelumnya dilakukan TURBT, laki-laki 23 pasien dan perempuan 4, dengan kelompok usia terbanyak pada 61 – 70 tahun (Purwaningsih, 2020), namun sampai saat ini belum didapatkan data rekurensi dan

progresifitas, maupun angka harapan hidup 5 tahun pasien kanker kandung kemih di RSUD Propinsi NTB karena berbagai keterbatasan.

Brucea Javanica, merupakan salah satu spesies dari genus *Brucea*, yang mempunyai sejarah panjang dalam berbagai macam pengobatan tradisional dan mempunyai peranan penting dalam pengobatan tradisional china (TCM) selama ratusan tahun. Tumbuhan ini tumbuh tersebar dari benua Afrika sampai Asia, mulai dari Asia timur, selatan, dan tenggara. Di Indonesia, dahulu *Brucea javanica* tersebar di beberapa daerah seperti Kalimantan Tengah dan Sulawesi Selatan, namun saat ini hanya ditemui di kebun-kebun industri jamu, dan selebihnya tumbuh sebagai semak belukar atau tanaman pagar (Dalimartha, 2000). Komponen-komponen yang terkandung pada tumbuhan ini mempunyai kegunaan yaitu antiinflamasi, antidiabetes, antikanker, dan anti malaria (Bagheri, 2018a, Ablat, 2014, Hamdin, 2017, Zhang, 2022), serta dapat meningkatkan respon imun tubuh melalui *Natural Killer cell* (Norzila, 2018). Di Indonesia sendiri, beberapa penelitian sudah menggunakan *Brucea javanica*, atau dikenal juga sebagai buah wali atau buah makassar, sebagai antidiabetes, anti malaria, maupun antikanker (Hamdin, 2017, Subeki, 2015, Sutejo, 2019).

Brucein-D merupakan senyawa quassinoid aktif terbanyak yang dapat diisolasi dari buah *Brucea javanica*. Senyawa ini mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker, sekaligus efek antiproliferatif dan apoptogenik, sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker,

terutama sel kanker pankreas dan payudara (Lai, 2017, Tan, 2019, Luo, 2020, Zhang, 2022). Sepanjang pengetahuan peneliti penggunaan senyawa *Brucein D* untuk menghasilkan apoptosis pada sel kanker kandung belum pernah dilakukan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang masalah, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen p53
2. Apakah pemberian senyawa *Brucein D* dapat menghambat proses anti-apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui hambatan ekspresi gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)
3. Apakah pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bax (*Bcl-2 associated X protein*)
4. Apakah pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bak (*Bcl-2 homologous killer*)
5. Apakah *Brucein D* dapat menginhibisi aktivitas protein Bcl-2 pada Analisis metode penambatan molekuler (*molecular docking*).

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa *Brucein D* terhadap proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24

2. Tujuan Khusus

1. Menguji kemampuan senyawa *Brucein D* dalam menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen p53
2. Menguji kemampuan senyawa *Brucein D* dalam menghambat proses anti-apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui hambatan ekspresi gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)
3. Menguji kemampuan senyawa *Brucein D* dalam menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bax (*Bcl-2 associated X protein*)
4. Menguji kemampuan senyawa *Brucein D* dalam menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bak (*Bcl-2 homologous killer*)
5. Menguji kemampuan senyawa *Brucein D* dalam menghambat aktivitas protein Bcl-2 pada Analisis metode penambatan molekuler (*molecular docking*)

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Keilmuan

- a. Memberikan pemahaman ilmiah mengenai pengaruh senyawa *Brucein D* dari ekstrak buah *Brucea javanica* terhadap peningkatan proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui induksi mediator pro-apoptosis dan inhibisi mediator antiapoptosis
- b. Konsep mengenai mekanisme kerja ekstrak berdasarkan parameter dan aktivitas yang diujikan dan diukur dapat menjadi acuan studi mengenai potensi bahan alam sebagai salah satu obat antikanker.

2. Manfaat Praktis

- a. Memberikan terapi alternatif baru untuk kanker kandung kemih yang lebih tidak invasif, aman, murah, dan terjangkau.
- b. Pengembangan senyawa *Brucein D* dari ekstrak buah *Brucea javanica* sebagai suplemen antikanker yang dapat meningkatkan nilai tambah tanaman tersebut sehingga dapat menunjang peningkatan pemanfaatannya.

D. Kebaruan (Novelty)

Penggunaan senyawa *Brucein D* untuk analisis sitotoksitas dan induksi apoptosis melalui perubahan ekspresi gen pro apoptosis p53, Bax, Bak, dan gen anti apoptosis Bcl-2 pada sel line kanker kandung kemih T24 terkait belum pernah dilakukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Anatomi dan Histologi Kandung kemih

Kandung kemih merupakan suatu organ berongga yang tersusun atas otot-otot yang dapat diregangkan yang berfungsi sebagai tempat penampungan sementara urin. Kandung kemih orang dewasa umumnya memiliki kapasitas penampungan urin sebesar 400-500 mL. Pada saat terisi penuh, kandung kemih dapat mengembang sampai di atas simfisis dan dapat dengan mudah dipalpasi ataupun diperkusi (Tanagho, 2013).

Kandung kemih yang kosong berbentuk seperti piramida segitiga yang memiliki bagian apeks, basis, permukaan superior, dan dua permukaan inferolateral. Pada bagian apeks, terdapat ligamentum umbilicale medianum (merupakan sisa dari urachus embrional) yang akan terus bergerak secara superior dan melekat pada dinding abdomen anterior ke umbilikus. Bagian basis dari kandung kemih berbentuk seperti segitiga terbalik dan mengarah ke bagian posteroinferior. Kedua ureter masuk ke kandung kemih pada bagian superior basis dan kemudian urin dialirkan melalui urethra yang terletak pada bagian inferior basis. Pada daerah diantara kedua ureter dan urethra didapati permukaan mukosa yang halus dan melekat erat dengan struktur otot polos di bawahnya yang

dikenal sebagai trigonum. Pada bagian inferolateral terdapat musculus levator ani dan musculus obturatorius internus (Tanagho, 2013).

Secara histologis, epitel yang melapisi kandung kemih juga merupakan lanjutan dari sistem pelvikalises dan ureter sehingga kandung kemi juga dilapisi oleh epitel transisional. Dinding kandung kemih terdiri dari 4 lapisan yaitu lapisan mukosa yang tersusun dari sel-sel epitel dipermukaan paling dalam, kemudian dilapisi jaringan sub-mukosa yang terdiri dari jaringan ikat, kemudian di luarnya dilapisi oleh otot-otot detrusor yang terdiri dari otot-otot sirkuler dan longitudinal. Otot-otot detrusor di bagian inferior atau disebut leher kandung kemih nantinya akan membentuk spingter urethra interna yang berfungsi mengontrol pengeluaran urin. Lapisan terluar merupakan jaringan serosa yang terdiri dari jaringan ikat (Tanagho, 2013).

B. Fisiologi Kandung kemih

Fungsi utama dari kandung kemih adalah sebagai tempat penampungan urin sementara dan berperan dalam proses miksi atau berkemih. Urin yang dihasilkan oleh ginjal akan dialirkan oleh ureter ke kandung kemih oleh karena adanya gaya gravitasi dan gerakan peristaltik yang teratur oleh otot polos sepanjang pelvis renalis dan ureter. Refleks berkemih merupakan refleks spinal yang terpicu saat adanya rangsangan pada reseptor regang di dalam dinding kandung kemih (Barett, 2012).

C. Kanker Kandung kemih

1. Epidemiologi

Kanker kandung kemih merupakan keganasan dengan angka kejadian terbanyak kedua dalam sistem urinarius. Menurut data dari GLOBOCAN tahun 2018, kanker kandung kemih menempati urutan 11 dari semua jenis kanker di seluruh dunia dengan estimasi sekitar 550.000 kasus baru setiap tahun dan terdapat 200.000 kematian (Bray, 2018, Richters, 2019). Insidensi rata-rata kanker kandung kemih setiap tahun didominasi laki-laki dengan angka 9,6 per 100.000 dibanding perempuan dengan angka 2,4 per 100.000. Angka kematian rata-rata setiap tahun per 100.000 cukup tinggi pada laki-laki di negara berkembang yaitu 4,3 sedangkan di negara maju lebih rendah yaitu 2,0. Angka kematian rata-rata setiap tahun pada perempuan lebih rendah berkisar 0,33 – 1 per 100.000 (Richters, 2019).

Kanker kandung kemih di Indonesia menurut data dari GLOBOCAN tahun 2018 menempati peringkat ke-14 dengan jumlah kasus baru sebanyak 6.716 kasus (1,9% dari total kasus kanker) dan 3.375 kasus kematian (1,6% dari total kematian karena kanker) (Bray, 2018). Data dari Rumah Sakit Hasan Sadikin (RSHS) Bandung dalam 7 tahun terakhir terdapat 351 kasus kanker kandung kemih, 253 kasus (72%) adalah karsinoma sel transisional (KST). Usia rerata 60,8 tahun, dengan usia terbanyak >60 tahun, dan rasio laki-laki : perempuan adalah 6:1. Di

Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) dan Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD) Jakarta, terdapat 340 penderita kanker kandung kemih selama periode Januari 1995 – Desember 2004, dimana terdapat peningkatan sekitar 15% pertahun di kedua rumah sakit tersebut dengan rerata usia 54 tahun. Karsinoma sel transisional (KST) merupakan jenis terbanyak (78,8%) dan sekitar 60% penderita didiagnosis sebagai tingkat lokal lanjut dan lanjut (Umbas, 2014).

Indonesia
Source: Globocan 2018

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site

Cancer	New cases				Deaths			
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk
Breast	58 256	1	16.7	4.61	22 692	2	11.0	1.96
Cervix uteri	32 469	2	9.3	2.58	18 279	3	8.8	1.64
Lung	30 023	3	8.6	1.47	26 095	1	12.6	1.30
Liver	18 468	4	5.3	0.88	18 148	4	8.8	0.87
Nasopharynx	17 992	5	5.2	0.73	11 204	6	5.4	0.52
Colon	15 245	6	4.4	0.72	9 207	7	4.4	0.40
Non-Hodgkin lymphoma	14 164	7	4.1	0.64	7 565	9	3.7	0.35
Rectum	14 112	8	4.0	0.66	6 827	10	3.3	0.31
Leukaemia	13 498	9	3.9	0.50	11 314	5	5.5	0.43
Ovary	13 310	10	3.8	1.06	7 842	8	3.8	0.69
Thyroid	11 470	11	3.3	0.47	2 119	19	1.0	0.07
Prostate	11 361	12	3.3	1.41	5 007	11	2.4	0.41
Corpus uteri	6 745	13	1.9	0.57	2 407	16	1.2	0.21
Bladder	6 716	14	1.9	0.36	3 375	14	1.6	0.17
Brain, nervous system	5 323	15	1.5	0.21	4 229	13	2.0	0.18
Lip, oral cavity	5 078	16	1.5	0.23	2 326	17	1.1	0.11

Gambar 1. Insidensi, mortalitas, dan prevalensi kanker di Indonesia (Bray, 2018. Global Cancer Statistics)

Data di RS Dr. Soetomo selama 5 tahun (2008-2012), terdapat 126 pasien KST kandung kemih dengan usia rerata 60,6 tahun dan terbanyak pada usia >60 tahun dengan rasio perbandingan laki-laki : perempuan

adalah 4,2:1 (Umbas, 2014). Di RSUD Provinsi NTB, angka kejadian kasus kanker kandung kemih pada periode tahun 2017-2018 sebanyak 90 kasus dengan perbandingan laki-laki dan perempuan sebesar 2,6 : 1. Usia terbanyak rata rata di atas 50 tahun (Anugrah, 2019).

2. Diagnosis

Diagnosis kanker kandung kemih berdasarkan keluhan, tanda dan gejala, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang. Sistoskopi dan biopsi/reseksi merupakan standar diagnostik untuk kanker kandung kemih. Diagnosis pasti ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan patologi anatomi. Kanker kandung kemih pada stadium awal disebut Kanker Kandung Kemih Non Invasi Otot (KKKNIO) atau *Non Muscle Invasive Bladder Cancer* (NMIBC), sedangkan stadium lanjut disebut Kanker Kandung Kemih Invasi Otot (KKKIO) atau *Muscle Invasive Bladder Cancer* (MIBC). Laporan dari RSHS dan RSCM menunjukkan bahwa sebagian kanker kandung kemih ditemukan pada stadium lanjut KKKIO/MIBC, yaitu masing-masing 90,8% dan 62,6% (Umbas, 2014).

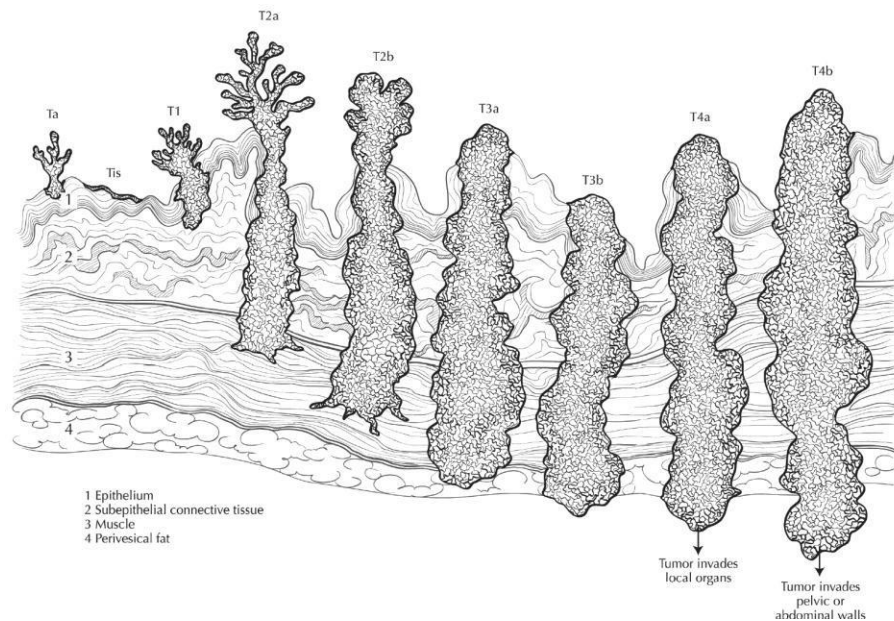
Pemeriksaan patologi anatomi merupakan alat baku emas untuk menegakkan diagnosis, jenis tumor, derajat diferensiasi dan derajat invasi (keterlibatan lapisan otot kandung kemih), adanya *carsinoma in situ* (CIS) serta invasi limfovaskuler. Spesimen biopsi dasar tumor diperlukan untuk mengetahui adanya invasi tumor pada lapisan otot dan adanya residual tumor paska tindakan TURBT (Umbas, 2014, NCCN, 2019)

3. Klasifikasi

Klasifikasi kanker kandung kemih berdasarkan sel penyusunnya dibagi menjadi *Transitional cell carcinoma* (TCC) atau karsinoma sel transisional dan *Non-Transitional Cell Carcinoma* (NTCC) atau karsinoma non sel transisional. Sebagian besar tumor kandung kemih adalah karsinoma sel transisional. Tumor ini biasanya berbentuk papiler, lesi eksofitik, sesile atau ulserasi. Karsinoma in situ berbentuk datar (non papiler anaplastik), sel-sel membesar dan nukleus tampak jelas. Dapat terjadi dekat atau jauh dari lesi eksofitik, dapat juga fokal atau difuse. Sementara karsinoma non-sel transisional meliputi karsinoma sel skuamous, adenokarsinoma, karsinoma urachal, metastatik karsinoma, dan *mixed carcinoma* (NCCN, 2019).

Klasifikasi kanker kandung kemih berdasarkan kebutuhan terapeutik terbagi menjadi 2 yaitu Kanker Kandung Kemih Non Invasi Otot (KKKNIO) atau *Non Muscle Invasive Bladder Cancer* (NMIBC) dan Kanker Kandung Kemih Invasi Otot (KKKIO) atau *Muscle Invasive Bladder Cancer* (MIBC). NMIBC termasuk jaringan ganas yang terbatas pada mukosa dan menyerang lamina propria diklasifikasikan sebagai stadium Ta dan T1, serta CIS (Carcinoma in situ) atau Tis (Tumor in situ) yaitu sel abnormal dengan *grading* tinggi (*high grade*) yang terbatas pada mukosa menurut sistem klasifikasi Tumor, Node, Metastasis (TNM). Klasifikasi ini diterapi dengan reseksi kandung kemih transurethral dengan kombinasi kemoterapi intravesika. Sedangkan MIBC adalah kanker kandung kemih

yang sudah melewati lapisan otot detrusor. Terapi pada klasifikasi ini meliputi sistektomi radikal, radioterapi, kemoterapi maupun kombinasi ketiganya. (Jones, 2016, Guzzo, 2016, Babjuk, 2019, Witjes, 2019).



Gambar 2. Staging kanker kandung kemih (AJCC, 2010)

Primary Tumor (T)		Regional Lymph Nodes (N)	
TX	Primary tumor cannot be assessed	Regional lymph nodes include both primary and secondary drainage regions. All other nodes above the aortic bifurcation are considered distant lymph nodes.	
T0	No evidence of primary tumor	NX	Lymph nodes cannot be assessed
Ta	Noninvasive papillary carcinoma	N0	No lymph node metastasis
Tis	Carcinoma in situ: "flat tumor"	N1	Single regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
T1	Tumor invades subepithelial connective tissue	N2	Multiple regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node metastasis)
T2	Tumor invades muscularis propria	N3	Lymph node metastasis to the common iliac lymph nodes
pT2a	Tumor invades superficial muscularis propria (inner half)	Distant Metastasis (M)	
pT2b	Tumor invades deep muscularis propria (outer half)	M0	No distant metastasis
T3	Tumor invades perivesical tissue	M1	Distant metastasis
pT3a	Microscopically		
pT3b	Macroscopically (extravesical mass)		
T4	Tumor invades any of the following: prostatic stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall		
T4a	Tumor invades prostatic stroma, uterus, vagina		
T4b	Tumor invades pelvic wall, abdominal wall		

Gambar 3. Klasifikasi TNM menurut American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010)

4. Terapi Kanker Kandung kemih

Tatalaksana pada kanker kandung kemih dapat dibedakan berdasarkan daya invasinya serta sel penyusun kanker tersebut. *Transurethral Resection of Bladder Tumor* (TURBT) merupakan tindakan awal, untuk penegakan diagnosis (Babjuk, 2019, NCCN, 2019).

Pada karsinoma sel transisional atau urothelial yang tidak invasif, stadium Ta dan T1 *low grade* dan *high grade*, serta Tis, umumnya dilakukan observasi atau pemberian kemoterapi intravesika dengan BCG, mitomicin, atau doxorubicin. Pada stadium T1 *high grade* dapat juga dilakukan sistektomi (Wiltjes, 2019). Fukuokaya pada tahun 2020 melaporkan bahwa dari 364 pasien NMIBC, dimana 182 menerima instilasi intravesika doxorubicin segera setelah TURBT, dan 182 lainnya hanya menjalani operasi TURBT saja, didapatkan perbaikan yang signifikan lamanya waktu rekurensi tumor pada kelompok dengan instilasi doxorubicin intravesika, walaupun tidak ada perbedaan signifikan pada progresifitas tumor (Fukuokaya, 2020).

Sedangkan yang bersifat invasif, stadium T2, T3, T4a, dan T4b, tatalaksana didasarkan dengan ada/tidaknya temuan nodul pada hasil CT/MRI abdomen dan pelvis. Umumnya, dilakukan sistektomi radikal pada pasien dan dilanjutkan kemoterapi adjuvan dengan cisplatin, kombinasi cisplatin dengan fluorourasil (5-FU), atau dengan methotrexate, vinblastin, adriamicin (doxorubicin), dan cisplatin. Apabila kanker telah menyebar ke organ lain, dapat dilakukan kemoterapi sesuai dengan organ yang

terdampak. Setelah dilakukan tatalaksana pada pasien, dilakukan *follow-up* untuk menilai keberhasilan pengobatan dan tindakan lanjutan yang diperlukan (Witjes, 2019, NCCN, 2019).

Kemoterapi intravesika pada keganasan kandung kemih mengalami banyak perkembangan jenis modalitas, jika sebelumnya hanya menggunakan *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) dan kemudian mitomicin, dalam perkembangannya saat ini mulai banyak dipakai doxorubicin / adriamicin dan yang lebih baru lagi dengan golongan taxane, yaitu docetaxel. Doxorubicin yang disetujui pemakaiannya oleh di USA oleh WHO tahun 1974 merupakan obat kemoterapi pada banyak jenis keganasan, termasuk kandung kemih. Doxorubicin sudah rutin digunakan untuk penatalaksanaan kanker kandung kemih superfisial atau NMIBC, dan rutin digunakan pada kanker kandung kemih paska tindakan reseksi tumor kandung kemih trans-urethra sejak sekitar tahun 1980 (Jauhianen, 1987). Berasal dari strain *wild type Streptomyces* terutama *Streptomyces peucetius* sebagai strain yang memproduksi daunorubicin, yang merupakan prekursor doxorubicin pada tahun 1969 (Lomovskaya, 1999). Doxorubicin menghambat progresi enzim topoisomerase II, sehingga menghambat proses replikasi dan pembelahan sel pada S-phase, serta meningkatkan produksi radikal bebas untuk sitotoksisitas. Efek samping doxorubicin termasuk mual, muntah, inflamasi rongga mulut, rambut rontok, supresi sumsum tulang, sampai toksik pada jantung (Chai, 1994, Tacar, 2012). Sebuah penelitian prospektif yang mengobservasi penderita

kanker kandung kemih superfisial selama 17 tahun paska pemberian kemoterapi intravesika menggunakan doxorubicin menyebutkan bahwa tidak ada perbaikan signifikan pada rekurensi, progresifitas, dan survival pasien dibandingkan kontrol (Cheng, 2005).

Docetaxel, merupakan obat kemoterapi kelas taxane yang digunakan untuk berbagai jenis keganasan, berasal dari ekstrak pohon *pacific yew* (semacam pinus), *Taxus brevifolia*, yang tumbuh di pesisir pasifik, barat laut Amerika Utara yang sangat langka, dan *Taxus baccata* yang merupakan pohon *European yew* di Eropa Barat, yang terkenal sebagai *the tree of death*, karena minum atau makan dari gelas atau piring yang terbuat dari pohon tersebut bisa menyebabkan kematian. Docetaxel menghambat depolimerasi dan disassembly mikrotubulus dan menghambat Guanosin-5 triphosphat (GTP), sehingga menghambat pembentukan mikrotubulus baru dan akhirnya menghambat pembelahan sel mitosis untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Mikrotubulus yang tidak dipolimerasi berdiam di intrasel akan menghambat Bcl-2, dan menginduksi apoptosis (De Ciccio, 2018, Ashraf, 2020), Untuk keganasan kandung kemih, docetaxel merupakan regimen lini kedua, dan biasanya digunakan secara intravena pada karsinoma urothelial yang sudah mengalami metastasis (Albany, 2015), atau penggunaan intravesika pada kegagalan kemoterapi intravesika dengan BCG sebelumnya (Barlow, 2013, Shantaram, 2021).

Selain terapi konvensional, terdapat berbagai pengobatan alternatif kanker terutama kanker kandung kemih yang telah dilakukan penelitian baik pengobatan dari bahan alami atau derivat lainnya. Seiring dengan kesuksesan beberapa penelitian tentang penggunaan obat herbal baik itu dari efek toxic pada sel kanker atau non toxic pada sel normal memberikan tuntutan yang lebih tinggi lagi dalam pengembangan penelitian tentang penggunaan tanaman obat sebagai modalitas pengobatan yang diharapkan bisa berdampingan dengan pengobatan kedokteran konvensional (Greenwell, 2015).

Dalam penelitian Begnini dkk., pada saat ini 47.1 % obat anti kanker adalah obat yang dimodifikasi dari produk alami atau derivat semisintesisnya. Salah satu obat yang berasal dari bahan alami yaitu propolis yang merupakan campuran dari kumpulan beberapa substansi yang dikumpulkan lebah madu (*Apis mellifera*). Mekanisme propolis sebagai obat anti kanker menunjukkan aktivitas proapoptosis, efek immunomodulatory, dan menekan proliferasi sel kanker. Propolis mempunyai pengaruh terhadap penekanan ekspresi Bcl-2 dan induksi apoptosis pada induksi kultur sel kanker kandung kemih (Begnini, 2014).

Pengobatan alternatif juga dapat diberikan sebagai kombinasi dengan pengobatan utama pada sel kanker kandung kemih, seperti penelitian oleh Cho, dkk Banyaknya sel kanker yang sudah resisten terhadap *Gamcitabine* yang merupakan inhibitor sintesis DNA sel kanker, yang disebut sebagai *GCB-resistant cell* (T24-GCB), dimana terjadi

penurunan *uptake* obat dan pengurangan konsentrasi obat di dalam intraselular yang disebabkan karena perubahan *efflux pumps* dan peningkatan metabolisme obat menyebabkan melemahnya jalur apoptosis dapat diatasi dengan pemberian Curcumin dan Resveratrol sehingga dapat menurunkan angka *GCB-resistant cell* (Cho, 2019), Curcumin sendiri mempunyai efek antikanker dengan cara menghambat proses angiogenesis, proliferasi, invasi, metastasis dan meningkatkan proses apoptosis sel kanker kandung kemih melalui hambatan jalur *Mitochondrial Membrane Permeabilization* (MMP) (Shi, 2017). Aktivitas antitumor curcumin seperti fragmentasi DNA, pelepasan sitokrom c dari mitokondria, dan aktivasi caspase-9 dan caspase-8 dapat ditingkatkan dengan pemberian kemoterapi kombinasi BCG intravesika dan curcumin dosis rendah disertai transmisi cahaya putih melalui serat fiber yang dimasukkan melalui kateter urethra 20 Fr (Roos, 2019).

Beberapa penelitian epidemiologi menjelaskan bahwa dengan mengkonsumsi beberapa jenis sayuran serta buah-buahan akan menurunkan resiko terkena kanker. Di dalam buah serta sayur mengandung substansi atau antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari radikal bebas salah satunya adalah *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan terjadinya kerusakan struktur DNA serta struktur molekular lainnya (Coccia, 2016).

D. *Brucea javanica*

Brucea javanica (BJ) pertama kali digunakan sebagai obat tradisional China dan dicatat pada buku *Omissions from the Compendium of Materia Medica* yang ditulis oleh Zhao Xue Ming (1368-1644). Buah ini digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit di China seperti kanker, disentri, malaria, gastritis ulcer dan penyakit lainnya. *Brucea javanica* tercatat secara resmi dalam *pharmacopeia China*. Belakangan ini karena kandungan quassinoid yang kaya dalam buah tersebut, banyak penelitian mulai diarahkan pada buah ini sebagai anti leukemia dan anti kanker (Tang, 1992, Lau, 2008, Liu, 2012, Yan, 2016). Di Asia, buah ini dikenal dengan nama *yadanzi*, di Malaysia dikenal dengan nama buah lada pahit, karena rasanya yang pahit, dan di Indonesia dikenal dengan nama buah makasar atau buah wali. *Brucea javanica* merupakan tanaman herbal yang mempunyai khasiat dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit, baik disentri, malaria, atau demam berdarah. Senyawa Brucein A dan Brucein D yang terkandung didalam buah tersebut mempunyai efek anti kanker (Subeki, 2015, Norzila, 2016, Muhartono, 2017a, Muhartono, 2017b, Lai, 2017, Luo, 2020, Liu, 2012, Tan, 2019).

Brucea javanica (L) tergolong dalam famili *Simaroubaceae*, merupakan buah yang memiliki rasa yang dingin, pahit, dan beracun yang tumbuh liar di alam atau pekarangan. Buah ini secara khas berbentuk bulat telur, keras, dan sedikit mengecil di puncak kepalanya dengan

panjang sekitar 6-10 mm dan diameter 4-7 mm. Biasanya buah akan berubah menjadi hitam atau coklat saat matang. Umumnya, buah dipanen pada musim gugur (Tang, 1992, Chen, 2012). Di Indonesia, buah ini banyak digunakan sebagai anti diabetes (Hamdin, 2017).



Gambar 4. Buah *Brucea javanica* / buah makassar / buah wali (Pandiangan, 2015)

Pada awal tahun 1973, bruceantin pertama kali dilaporkan memiliki efek anti leukemia dan kemudian diikuti oleh laporan-laporan lain tentang keberhasilan komponen *Brucea javanica*. Penelitian saat ini banyak ditujukan untuk membuktikan efek anti kanker dari *Brucea javanica* karena mengandung komponen aktif pada buah dan bijinya terutama quassinoid, triterpenoids, flavonoid, oleic acid, linoleic acid, dan alkaloid. *Brucea javanica* mempunyai kemampuan induksi apoptosis melalui aktivasi *caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathway*, aktivasi p53, regulasi Bax dan Bak, dan hambatan NF- κ B, Bcl-2, dan Bcl-XL, serta

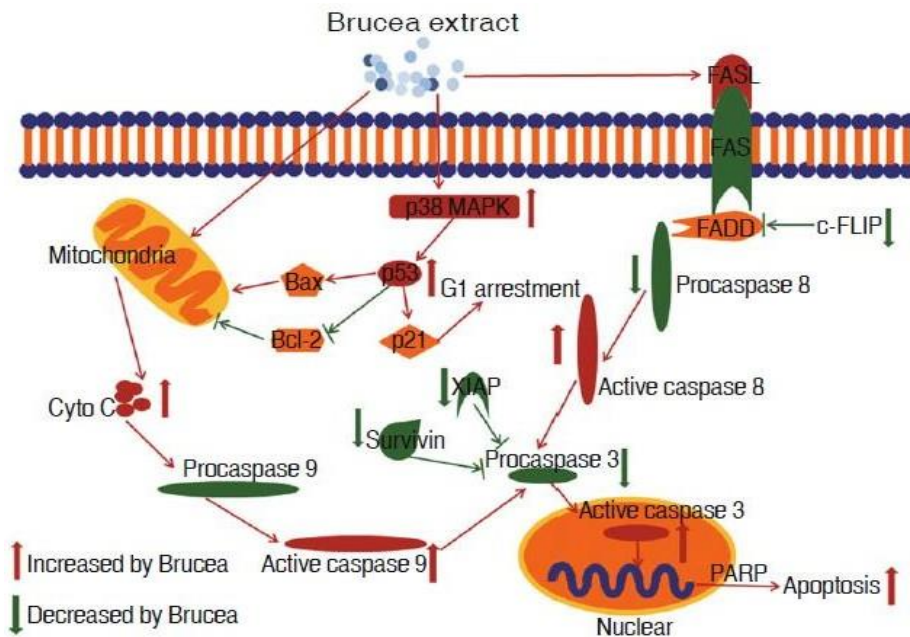
melalui jalur ekstrinsik yaitu *death receptor pathway* dan produksi ROS (Chen, 2012, Sutiningsih, 2013, Muhartono, 2017a, Muhartono, 2017b, Bagheri, 2018a, Bagheri 2018b).

Selain menginduksi apoptosis, *Brucea javanica* juga menginduksi *arrest* siklus sel pada fase G0/G1 bila ada sel rusak atau terganggu, melalui regulasi p53 dan Cyclin D1, sehingga proliferasi sel terhenti (anti proliferaatif) dan sehingga mencegah perkembangan sel selanjutnya menjadi sel kanker (Lau, 2008, Lou, 2010, Wang, 2016). *Brucea javanica* juga menginduksi proses autophagi, dimana tubuh melakukan eliminasi terhadap sel-sel rusak dan mati, sehingga dapat terjadi regenerasi sel (Yan, 2015, Fan, 2020).

Brucea javanica menghambat enzim DNA topoisomerase II yang berfungsi dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi, dan proliferasi sel kanker, sehingga terjadi *Protein linked DNA breaks* (PDLB) yang menyebabkan fragmentasi DNA sel kanker (Subeki, 2015). Salah satu komponen penting dari proses apoptosis adalah produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), dan *Brucea javanica* dapat menginduksi produksi ROS sehingga merangsang p38-*mitogen activated protein kinase* (MAPK), sebuah protein kinase yang berperan terhadap rangsangan stress sehingga menginduksi proses apoptosis (Wang, 2016, Fan, 2020).

Selain dari buah dan biji, penelitian menunjukkan bahwa beberapa komponen lain buah ini juga memiliki efek anti kanker seperti daunnya, mengandung luteolin alami yang merupakan komponen *flavonoid* yang

dapat menginduksi apoptosis dan juga dapat meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dan mengakibatkan apoptosis (Wicaksono, 2015, Norzila, 2016). Ekstrak akar dan batangnya yang diambil menggunakan ekstrak kloroform juga mempunyai efek anti kanker (Wardoyo, 2011).



Gambar 5. Gambaran Skematik Apoptosis yang diinduksi Brucea javanica (Yan, 2016).

Brucea javanica juga menunjukkan *relatively selective cytotoxicity* pada sel kanker dibanding sel normal. bahkan pada beberapa penelitian menunjukkan hasil yang lebih superior dibanding kemoterapi dengan angka kejadian efek samping seperti mual, muntah, diare, dan lekopenia yang jauh lebih rendah. Penelitian pada beberapa sel line kanker didapatkan angka kematian sel karena apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan sel normal, dan ekspresi peningkatan p53 tumor supressor gen yang lebih tinggi secara signifikan dibanding sel normal (Gao, 2011,

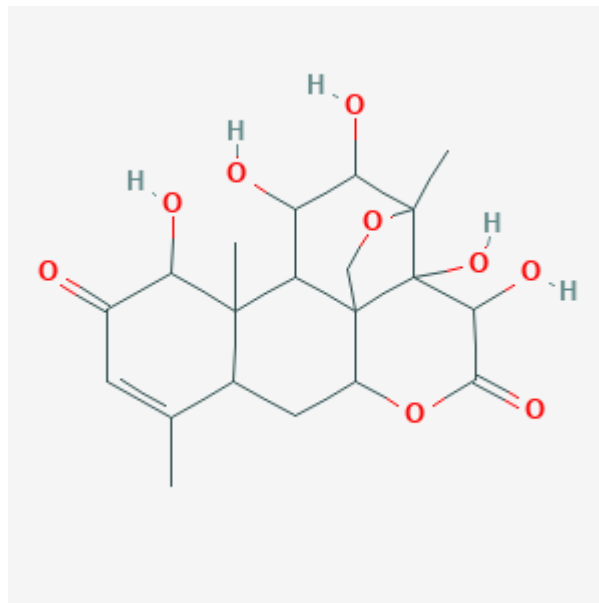
Wu, 2018). Dengan kemampuan untuk regulasi gen pro-apoptosis (Bax, Bak) dan anti-apoptosis (Bcl-2, NFκB), *Brucea javanica* juga dapat menurunkan kejadian resistensi obat kemoterapi (Yan, 2016). Selain itu penelitian dengan menggunakan kombinasi mikroemulsifikasi *Brucea javanica* dan obat kemoterapi docetaxel, didapatkan efek sinergis, peningkatan waktu paruh, serta peningkatan efektivitas docetaxel, dibandingkan dengan pemberian obat kemoterapi docetaxel sebagai monoterapi (Ma, 2013, Wu, 2018).

Quassinoid berasal dari kata Quassi yang merupakan nama seorang dokter yang menggunakan Simaroubaceae sebagai obat anti demam. Merupakan komponen khas dari famili *Simaroubaceae*, dan merupakan komponen aktif utama yang mempunyai efek anti kanker, beberapa komponen penting quassinoid adalah *Brucein A-M*, *bruceantin*, *bruceanol*, *bruceantinoside*, *yadanzioside* dan lain-lain, yang telah dipakai untuk banyak penelitian anti kanker, dan saat ini sudah lebih dari 200 macam quassinoid yang dikenal (Chen, 2012, Alves, 2014).

E. Brucein D

Brucein D merupakan salah satu komponen bioaktif quassinoid terbanyak yang yang dapat diisolasi dari buah *Brucea javanica*, dan dalam beberapa penelitian disebutkan memiliki aktivitas anti kanker yang lebih baik dibandingkan golongan quassinoid lainnya, terutama pada kanker pankreas, payudara, dan paru (Lau, 2008, Liu, 2012).

Brucein D mempunyai nomer CAS (*Chemical Abstracts Service*) 21499-66-1 dan rumus molekul $C_{20}H_{26}O_9$, serta berat molekul 410.4150 g/mol. Saat ini penggunaannya masih dalam tahap penelitian dan pengembangan, belum digunakan secara komersial untuk pengobatan secara berdiri sendiri karena sifatnya yang tidak stabil pada suhu panas dan tidak larut air (*fat-soluble compounds*). Sediaan komersialnya berupa emulsi minyak sebagai satu kesatuan dengan komponen aktif lainnya yaitu dalam bentuk *Brucea javanica oil emulsion* (BJOE) (Dou, 2018).



Gambar 6. Struktur kimia *Brucein D*
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brucein-D>).

Aplikasi Brucein D paling banyak digunakan untuk efek anti kanker, dibandingkan dengan komponen *Bruceae* lainnya yang juga banyak digunakan untuk aktivitas anti inflamasi, anti diabetic, atau penyakit lainnya. Penelitian menunjukkan bahwa Brucein D dapat menghinibisi

proliferasi dan pembentukan koloni sel kanker paru (*Non Small Cell Lung Carcinoma*), sekaligus menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria, dan overproduksi ROS, serta menghentikan siklus sel pada fase G0/G1. Selain itu, Brucein D juga menurunkan potensial membran mitokondria, yang dapat menyebabkan keluarnya mediator-mediator pro-apoptosis (Xie, 2019, Tan, 2019). Demikian juga untuk sel line leukemia dan kanker payudara, Brucein D juga menunjukkan efek anti proliferasi, anti invasi, dan anti migrasi (Zhang, 2016, Luo, 2020).

Penelitian aktivitas antikanker Brucein D pada kanker pankreas termasuk cukup banyak dibanding kanker lainnya, karena di China pengobatan kanker pankreas dan hepatoseluler masih banyak melibatkan obat tradisional. Pada sel line 3 kanker pankreas (PANC-1, CaPan-2, dan SW-1990) Brucein D menunjukkan hambatan migrasi sel kanker, induksi apoptosis, dan *arrest* siklus sel baik di G0/G1, maupun di fase S, dengan efek yang setara obat kemoterapi gemcitabin dan camptothecin, namun menunjukkan efek sitotoksik yang lebih rendah pada sel pankreas non tumorigenik PPC, dan sel hepatosit WRL68 dibanding obat kemoterapi (Lau, 2009, Liu, 2012, Lai, 2017).

Dari penelusuran literatur, untuk keganasan urogenital, sejauh ini belum ada yang menggunakan Brucein D sebagai terapi anti kanker, walaupun demikian, sudah ada beberapa penelitian yang menggunakan ekstrak buah *Brucea javanica* pada kanker urogenital. Seperti studi oleh Lou dkk pada tahun 2010, menggunakan sel line kanker kandung kemih

T24 in vitro, didapatkan adanya peningkatan aktivitas apoptosis sel T24 dan penurunan viabilitas sel T24 sesuai peningkatan dosis *Brucea javanica* yang diberikan, dengan mekanisme kerja melalui aktivasi jalur caspase, dan inhibisi NF- κ B dan COX-2 (Lou, 2010).

Pada pasien yang diberikan kemoterapi intravesikal setelah dilakukan *Transurethral Resection of Bladder Tumor* (TURBT), menggunakan perfusi intravesika *Brucea javanica* 10% dibandingkan dengan mitomicin dan BCG, pada 178 pasien kanker kandung kemih superfisial diikuti selama 2 tahun, didapatkan *relaps rate* pada kelompok *Brucea javanica* sebesar 14,04% sedangkan pada kelompok mitomicin 34% dan kelompok BCG 18 persen, dengan kejadian efek samping pada kelompok *Brucea javanica* hanya 12% berbanding 43% dan 83% pada kelompok mitomicin dan BCG, terutama kejadian sistitis (Wang, 2011).

Pada kanker prostat pemberian kombinasi *Brucea javanica* dengan *gonadotropin releasing hormone (GnRH)-analogue (triptorelin)* memberikan efikasi yang lebih baik secara signifikan dibandingkan dengan pemberian triptorelin saja (Yan, 2016).

E. Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses dimana sel akan membelah menjadi dua sel anak yang identik, meliputi duplikasi DNA, pembagian organela, dan separasi sitoplasma. Pada sel bernukleus (eukariotik), siklus sel

dibagi menjadi dua bagian besar yaitu interfase dan mitotik (termasuk mitosis dan sitokinesis). Pada interfase, sel akan tumbuh dan mengumpulkan energi dan nutrisi yang diperlukan dalam fase pembelahan dan replikasi DNA. Pada fase mitotik, kromosom, organela, dan sitoplasma membelah menjadi dua sel anak. Langkah-langkah dalam proses ini dikontrol pada setiap *checkpoint*, untuk menentukan apakah sel tersebut akan melanjutkan siklusnya atau tidak (Alberts, 2014)

Interfase dibagi menjadi tiga fase yaitu G₁ (Gap 1), S (Sintesis), G₂ (Gap2), dilanjutkan dengan fase mitotik (pembelahan). Setelah selesai pembelahan, sel akan masuk kedalam keadaan diam/istirahat (G₀). Cyclin D memegang peranan sangat penting dalam memulai proses siklus sel, ikatannya dengan CDK (*cyclin dependent kinase*) membentuk kompleks yang berperan untuk memulai fase S (Sintesis) serta merangsang progresi siklus sel dan proliferasi sel (Alenzi, 2014, Albert, 2014). Sebelum memasuki fase mitosis, akan ada *checkpoint* yang memastikan bahwa kromosom dan DNA yang direplikasi berada dalam keadaan normal. *Checkpoint* ini terutama diregulasi oleh p53 tumor supresor gen. Jika ada kerusakan DNA, p53 akan memperbaiki atau mengaktifasi p21 yang menyebabkan inaktivasi Cyclin – CDK kompleks, sehingga terjadi *arrest* siklus sel di fase G₁. Sel tidak akan memasuki fase sintesis namun memasuki fase apoptosis. Jika p53 mengalami mutasi, maka sel dengan kerusakan DNA tetap melanjutkan pertumbuhannya dan menjadi sel kanker (Aubrey, 2018).

G. Apoptosis

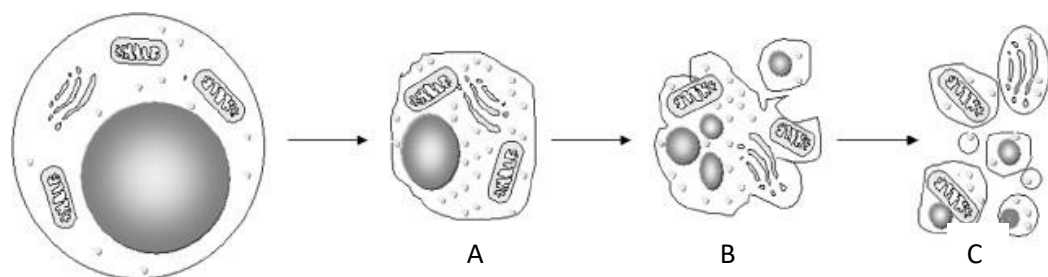
Istilah apoptosis (a-po-toe-sis) pertama kali digunakan oleh Kerr, Wyllie dan Currie pada tahun 1972 untuk menggambarkan kematian sel. Tetapi bukti pertama tentang *Programmed Cell Death* (PCD) diberikan oleh Kerr dan ia menyebutnya sebagai penyusutan nekrosis. Apoptosis adalah kata Yunani yang berarti "Jatuh" seperti daun dari pohon di musim gugur (Kumar, 2015, Zimmerman, 2001).

1. Mekanisme Apoptosis

Apoptosis disebut sebagai kematian sel tipe 1 dan nekrosis sebagai kematian sel tipe 3. Ini adalah salah satu bentuk PCD (*Programmed Cell Death*) yang menjaga keseimbangan antara sel normal dan sel mati. Bentuk-bentuk lain dari PCD termasuk autophagi dan nekrosis terprogram dapat dibedakan berdasarkan morfologi mereka (Kumar, 2015).

Apoptosis adalah komponen vital yang prosesnya ireversibel, ditentukan secara genetik dari berbagai proses yang meliputi pergantian sel normal, perkembangan dan berfungsinya sistem imun tubuh, perkembangan embrionik, atrofi hormonal dan kematian sel secara kimiawi, dan lain-lain (Kumar, 2015, Zimmerman, 2001). Salah satu contoh penting dalam apoptosis adalah pemisahan jari dalam perkembangan pembentukan telapak tangan, dimana didapatkan kematian sel hanya pada sel-sel interdigiti, sehingga didapatkan bentuk telapak tangan yang benar (Alberts, 2014).

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang paling banyak diteliti, yang memainkan peran penting dalam supresi tumor intrinsik. Proses apoptosis yang terganggu merupakan faktor utama dalam pengembangan dan perkembangan kanker dan memainkan peran penting dalam resistensi sel tumor terhadap terapi konvensional. Ciri-ciri morfologis khas apoptosis meliputi penyusutan sel (*cell shrinkage*), kondensasi nukleus (*pyknosis*), kondensasi kromatin dan pembentukan *chromatin bodies*, fragmentasi DNA nukleus (*karyohexis*), disipasi potensial membran mitokondria dan *blebbing* membran plasma, diakhiri dengan pembentukan *apoptotic bodies*. Proses ini berlangsung dalam kontrol sel yang sangat ketat. *Cell shrinkage* dan *pyknosis* adalah tanda yang pertama muncul dalam proses apoptosis. *Cysteine aspartate-specific proteases (caspases)* adalah karakteristik khas pada proses apoptosis, karena berfungsi sebagai inisiator dan eksekutor pada kaskade proses apoptosis (Kumar, 2015, Razaghi, 2018, Zimmerman, 2001).



Gambar 7. Proses apoptosis, A. *cell shrinkage* dan kondensasi nukleus (*pyknosis*), B. Fragmentasi nukleus (*karyohexis*), degradasi DNA, dan pembentukan *blebs*. C. Pembentukan *apoptotic bodies* (Bohm, 2003)

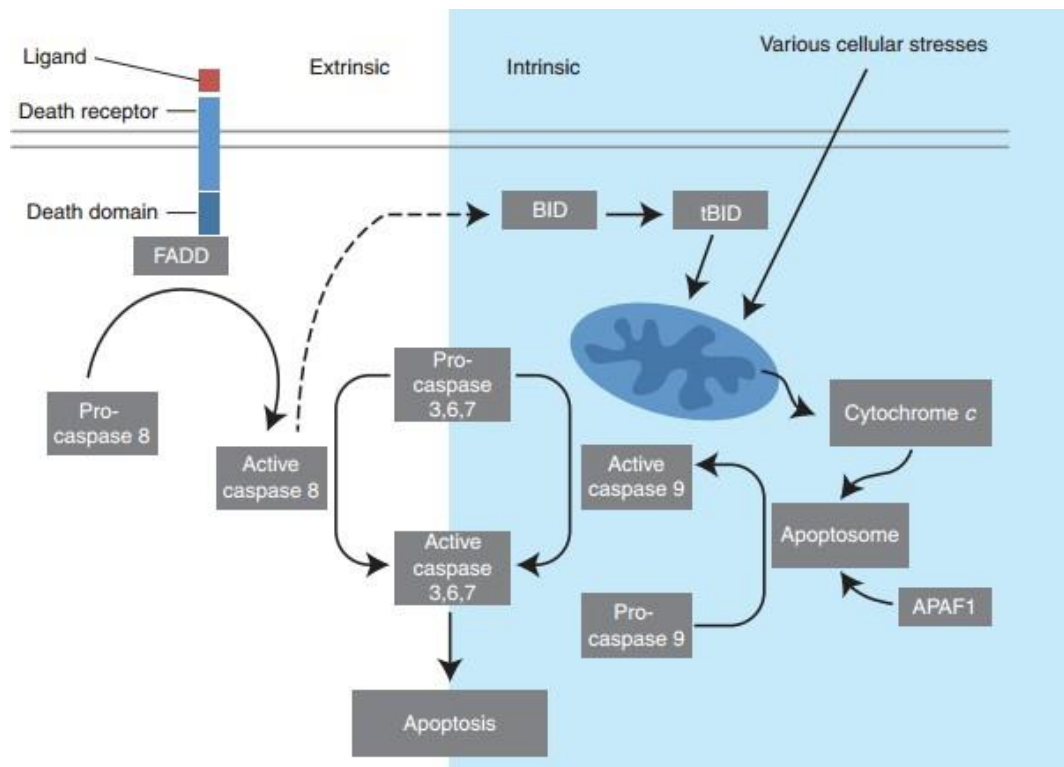
Terdapat dua jalur utama pada proses apoptosis yaitu jalur intrinsik dan ekstrinsik (Razaghi, 2018). Semua jalur apoptosis pada akhirnya akan bertemu pada jalur eksekusi. Jalur ini adalah jalur akhir apoptosis di mana semua jalur sebelumnya digabungkan. Jalur ini dimediasi oleh caspase eksekutor yaitu caspase-3, caspase-6 dan caspase-7. Apoptosis pada jalur intrinsik dan ekstrinsik bertemu di caspase-3. (Kumar, 2015).

a) Jalur intrinsik (McIlwain, 2013, Alberts, 2014)

Dikenal juga sebagai jalur mitokondria, dimana mitokondria merupakan struktur yang sangat penting, karena tanpa mitokondria sel tidak bisa bernafas secara aerob, dan akan segera mati. Jalur ini biasanya diaktivasi oleh kejadian-kejadian di dalam sel, sebagai respon terhadap stress, seperti kerusakan DNA dan gangguan siklus sel, atau sebagai respon terhadap sinyal dari dalam sel. Protein apoptosis mempengaruhi mitokondria melalui berbagai macam cara, salah satunya dengan menyebabkan pembengkakan mitokondria, pembentukan lubang pada membran mitokondria (*membran pores*), atau melalui peningkatan permeabilitas membran mitokondria sehingga terjadi pelepasan efektor apoptosis. Kejadian tumor biasanya berkaitan dengan gangguan faktor intrinsik.

Protein kunci pada jalur ini adalah sitokrom c, saat dilepaskan dari dalam mitokondria ke dalam sitosol akan berikatan dengan Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) membentuk apoptosome. Pelepasan sitokrom c ke dalam sitosol diregulasi oleh

protein Bax dan Bak yang menempel pada membran luar mitokondria. aktivasi kedua protein tersebut akan menghambat protein anti apoptosis Bcl-2..



Gambar 8. Jalur ekstrinsik dan intrinsik apoptosis. (McIlwain, 2013).

b) Jalur Ekstrinsik (McIlwain, 2013, Alberts, 2014)

Dimulai dengan adanya ikatan protein ekstraseluler dengan *death receptor* di permukaan sel. *Death receptor* merupakan anggota *TNF receptor superfamily* (*Tumor Necrosis Factor*), termasuk diantaranya reseptor $\text{TNF-}\alpha$ (TNFR-1 dan 2), CD95 (Fas atau Apo-1), dan TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). $\text{TNF-}\alpha$ adalah sebuah sitokin yang diproduksi oleh makrofag, ikatan antara $\text{TNF-}\alpha$ pada reseptor TNFR-1 mengakibatkan aktivasi

caspase melalui TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) dan FADD (*Fas-associated death domain protein*).

Reseptor Fas (*First apoptosis signal*), dikenal juga sebagai Apo-1 atau CD95, merupakan protein transmembran anggota TNF *family* yang dapat berikatan dengan FasL (Fas ligand), menginduksi pembentukan DISC (*Death-inducing signalling complex*), yang mengaktifasi caspase-8 dan caspase-10.

2. Peranan Bcl-2 Family pada Apoptosis

Protein Bcl-2 family mengatur regulasi jalur intrinsik apoptosis secara ketat. Protein ini mengatur pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke dalam sitosol. Beberapa anggota Bcl-2 family adalah protein pro-apoptosis yang meningkatkan pelepasan sitokrom c, seperti Bax dan Bak, sedangkan beberapa lainnya adalah anti-apoptosis, seperti Bcl-2 dan Bcl-XL, keseimbangan antara pro dan anti-apoptosis ini sangat penting untuk menentukan hidup dan matinya sel secara fisiologis, dan mencegah perkembangan sel patologis (Alberts, 2014).

Mulainya proses apoptosis diawali dengan induksi *BH3 only proteins* (Bcl-2 Homologous 3) seperti BID (*BH3 interacting domain death agonist*), PUMA, NOXA, BIM, BAD oleh sinyal apoptosis dari dalam sel, sehingga terjadi aktivasi protein Bcl-2 pro-apoptosis (Bax, Bak), sekaligus mengikat dan menghambat kerja protein Bcl-

2 pro-survival atau anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL). Aktivasi Bak dan Bax, mengubah permeabilitas membran luar mitokondria, sehingga sitokrom c dapat dilepas ke dalam sitosol, dan memulai kaskade caspase untuk proses apoptosis (Aubrey, 2018).

Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) merupakan protein yang dikodekan oleh gen BCL-2 yang terletak pada kromosom 18q21.33, merupakan protein anti-apoptosis, yang fungsi normalnya adalah untuk meningkatkan sel survival dan menghambat kerja protein pro-apoptosis bersama dengan Bcl-XL dan Mcl-1. Ekspresi berlebihan dari Bcl-2 dapat mengakibatkan terjadinya kanker atau penyakit autoimun, sehingga saat ini telah dikembangkan berbagai inhibitor selektif Bcl-2, seperti *Navitoclax* (ABT-263) merupakan molekul kecil mimetik BH3, secara efisien berikatan dengan Bcl-2, Bcl-xL, dan Bcl-w dengan aktivitas antitumor melawan sel limfoma, leukemia, dan myeloma. Dalam uji klinis fase I, penggunaan *navitoclax* sangat terbatas karena adanya gangguan trombosit akibat hambatan Bcl-XL (trombosit perlu Bcl-XL untuk tetap hidup) sehingga pemakaiannya pada leukemia sangat terbatas.

Obat lainnya adalah *Venetoclax* (ABT-199), versi *navitoclax* yang disempurnakan, tidak menargetkan Bcl-xL tetapi mengikat Bcl-2 secara khusus. *Venetoclax* merupakan platelet penghambat Bcl-2 secara selektif, diberikan per oral dengan aktivitas antitumor terhadap berbagai jenis limfoma dan leukemia. *The US Food and*

Drug Administration (FDA) menyetujui *venetoclax* (*Venclexta™*) untuk pengobatan leukemia limfositik kronis pada tahun 2016. Uji klinis lanjutan menunjukkan *venetoclax* efektif sebagai monoterapi atau politerapi terhadap keganasan hematologis (Perini, 2018).

Bax (*Bcl-2 associated X protein*), protein yang dikode oleh gen BAX yang berlokasi di kromosom 19q13.33, dan Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*), protein yang dikode oleh gen BAK1 yang berlokasi di 6p21.31, merupakan anggota Bcl-2 family yang bersifat pro-apoptosis. Kedua protein menginduksi pembukaan *Mitochondrial voltage-dependent anion channel* (VDAC), yang mengakibatkan hilangnya membran potensial dan lepasnya sitokrom c ke dalam sitosol. BAK1 juga membentuk pori-pori oligomeric di membran luar mitokondria, sehingga mempermudah faktor-faktor pro-apoptosis lain untuk keluar. Ekspresi kedua gen ini diatur juga oleh p53 tumor supressor gen. Obat-obatan yang mengaktivasi Bax dan Bak memberikan harapan baru untuk terapi anti kanker, sedangkan obat-obatan yang menghambat Bax dan Bak sangat berguna pada penyakit neurodegeneratif dan autoimun, termasuk Amyotrophic Lateral Sclerosis (Westphal, 2014).

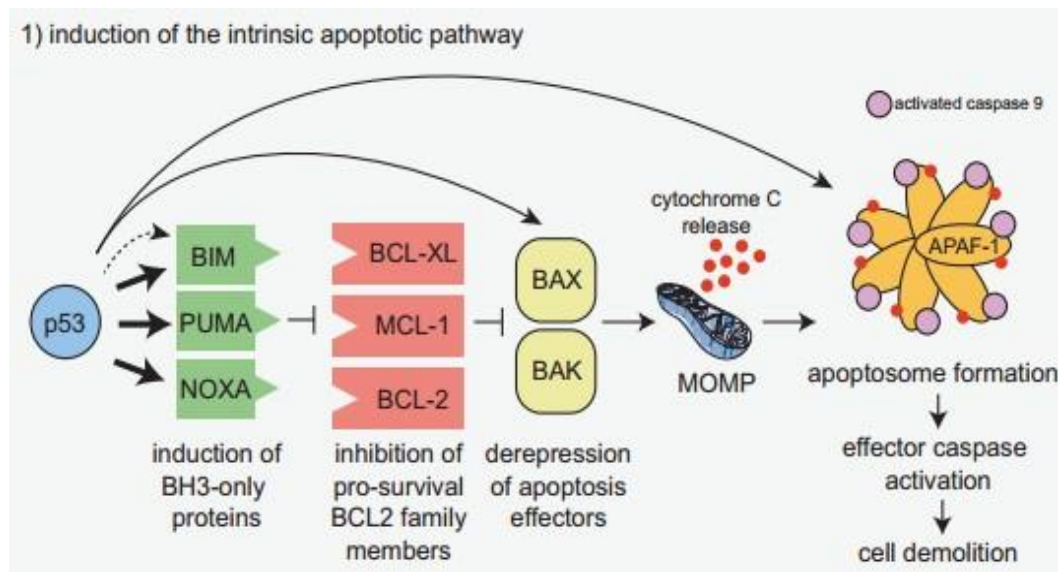
3. Induksi Apoptosis melalui p53

Tumor protein p53 dikenal juga dengan p53 cellular tumor antigen atau p53 tumor supressor gen, merupakan protein yang

dikode oleh gen TP53. Nama p53 diberikan sejak tahun 1979 berdasarkan berat molekulnya yaitu 53 kDa. Gen TP53 berlokasi pada lengan pendek kromosom 17 (17p13.1). Lebih dari 50 persen kejadian kanker didapatkan adanya mutasi pada gen ini, sehingga menimbulkan asumsi bahwa gen ini berkaitan erat dengan kejadian kanker. Gen ini mengkode protein p53 yang berkaitan dengan DNA untuk regulasi dan mencegah mutasi pada genome. Oleh sebab itu, protein p53 juga disebut sebagai *guardian of the genome*, sebab mempunyai beberapa fungsi, antara lain (Amaral, 2010) :

- Regulasi proses siklus sel, apoptosis, dan stabilisasi genome
- Aktivasi protein DNA *repair* saat didapatkan kerusakan DNA, termasuk pada proses penuaan.
- *Arrest* siklus sel pada *checkpoint* G1/S saat ditemukan kerusakan DNA, sehingga memberikan waktu untuk perbaikan dan melanjutkan siklus sel atau inisiasi apoptosis (jika tidak bisa diperbaiki)
- Mencegah pembelahan sel pada sel-sel tua

Mekanisme kerja apoptosis terjadi setelah p53 mengenali DNA yang rusak, kemudian terjadi aktivasi p21, yang merupakan *cyclin dependent kinase inhibitor*, yang dapat menghambat kompleks cyclin/CDK, sehingga terjadi hambatan siklus sel. Studi lain menunjukkan ekspresi berlebih Bcl-2 dapat menghambat apoptosis yang diinduksi p53 (Amaral, 2010, Aubrey, 2018).



Gambar 9. Mekanisme *p53-induced apoptosis*. Model yang menggambarkan mekanisme dimana p53 teraktivasi menginduksi apoptosis melalui jalur yang diregulasi oleh BCL-2 (Aubrey, 2018)

Selain melalui jalur intrinsik, beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa p53 dapat menginduksi apoptosis melalui jalur ekstrinsik dengan induksi *death receptor* dan, aktivasi TNFR, dan transkripsi fas (Amaral, 2010)

4. Regulator Negatif pada Apoptosis

Sel-sel tumor berevolusi untuk menghindari kematian sel secara apoptosis. Regulasi negatif apoptosis dapat menghambat jalur pensinyalan kematian sel. Beberapa famili protein bertindak sebagai regulator negatif yang mempunyai sifat anti-apoptotik, misalnya IAPs, XIAP (*X-linked IAP*), survivin, dan Bcl-2 atau faktor prosurvival seperti *cellular FLICE-like inhibitory protein* (cFLIP) dan NF- κ B. Famili IAP dapat menghambat aktivasi caspase-3 dan

caspase-7 serta berhubungan dengan kejadian resistensi obat kemoterapi. Survivin dapat digunakan sebagai model *molecular targeted therapy* karena diekspresikan secara berlebihan dalam sel kanker dan jarang terdeteksi dalam sel normal (Razaghi, 2018).

5. Peranan Caspase pada Apoptosis

Caspase, *cystine aspartic proteases*, merupakan kumpulan enzim protease yang memegang peranan penting terhadap kematian sel melalui proses apoptosis atau inflamasi. Caspase berada dalam bentuk tidak aktif dalam sel tubuh, setelah diaktifkan, maka akan terjadi kematian sel yang terprogram dengan kontrol yang ketat, dan dampak minimal pada jaringan sekitar yang tidak terdampak. Proses ini bersifat irreversibel. Peranan enzim ini dalam proses apoptosis pertama kali diidentifikasi pada tahun 1993, sampai dengan tahun 2009 telah teridentifikasi 12 jenis caspase pada manusia (McIlwain, 2013, Kumar, 2015).

Secara umum, caspase diklasifikasikan berdasarkan perannya dalam apoptosis, yaitu caspase inisiator, caspase-2, -8, -9, -10, dan caspase efektor / eksekutor, caspase-3, -6, -7. Caspase berada dalam bentuk tidak aktif (pro-caspase) dan harus diaktifkan baik dengan dimerisasi maupun *cleavage* (McIlwain, 2013):

Gangguan pada caspase dapat menyebabkan beberapa penyakit. Adanya defisiensi caspase berhubungan dengan kejadian

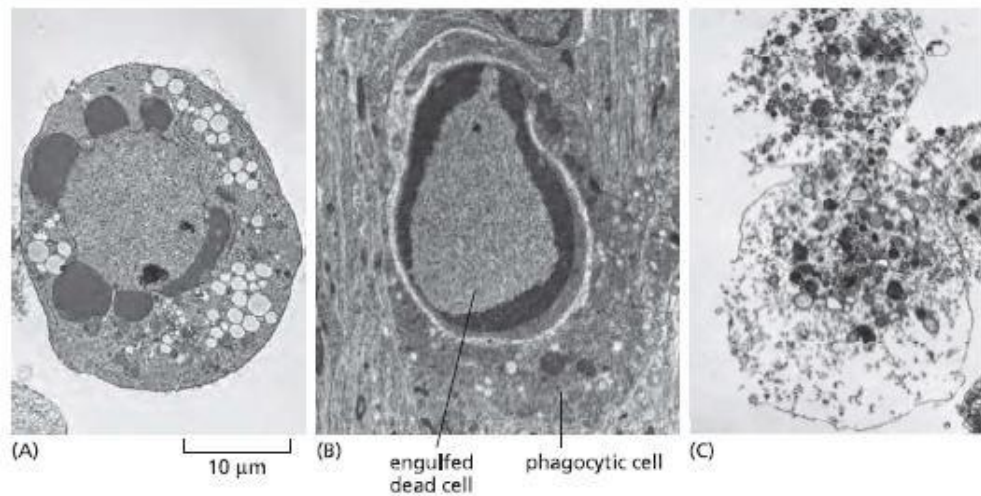
tumor atau kanker oleh karena gangguan apoptosis, sedangkan ekspresi caspase berlebihan menyebabkan kematian sel berlebih seperti pada penyakit neurodegeneratif, contohnya Alzheimer, dimana terjadi kehilangan banyak sel neuron (McIlwain, 2013).

6. Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

Apoptosis, yang merupakan kematian sel terprogram, harus dibedakan dengan nekrosis, yang merupakan kematian sel tidak terprogram, karena prosesnya berbeda dan implikasi klinisnya juga berbeda. Secara garis besar, ada beberapa perbedaan utama sel apoptosis dengan nekrosis, yaitu :

Tabel. 1. Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis (Bohm, 2003)

	Apoptosis	Nekrosis
Stimulus	Fisiologis	Patologis
Sel yang terlibat	Satu sel	Banyak sel atau jaringan
Integritas membran sel	Intak	Hancur
Volume sel	Mengecil (<i>condensed</i>)	Membesar (<i>onkosis</i>)
Struktur nukleus	Pyknosis, karyohexis	Karyolisis
Kromatin	Kondensasi	Lisis
Organela	Tetap intak sampai akhir poses (fagosit)	Hancur sejak proses awal
Kebutuhan Energi	Ya	Tidak
Fragmentasi DNA	Pembelahan interkromosomal	Random
Bentuk akhir	Apoptotic bodies	Disintegrasi
Reaksi inflamasi	Tidak ada	Ya, luas



Gambar 10. Gambar A dan B menunjukkan sel yang mengalami apoptosis dengan membran sel intact, ukuran mengecil, nukleus kondensasi, sedangkan gambar C menunjukkan sel yang mengalami nekrosis, dengan membran sel; yang pecah, dan nukleus serta organela tidak beraturan. (Alberts, 2014)

7. Identifikasi Apoptosis

Penelitian mengenai apoptosis terus berkembang karena memberikan banyak harapan terhadap pengobatan kanker, penyakit degeneratif, dan penyakit autoimun. Penelitian-penelitian efektifitas obat-obat baru, ekstrak tumbuhan, atau senyawa kimia membutuhkan uji sel. Senyawa tersebut harus dapat dinilai sitotoksitasnya, dan ditentukan viabilitas sel (sel yang hidup, terhambat, atau mati) karena senyawa tersebut. Viabilitas seluler dan aktifitas metabolik sel dapat diukur dengan mengukur *turnover rate*, yaitu kemampuan reduksi atau degradasi suatu senyawa atau bahan. Pada umumnya digunakan garam tertazolium (MTT, MTS, WST), atau resazurine. Garam tetrazolium tidak berwarna, namun akan menjadi berwarna bila membentuk produk formazan. Garam

tertazolium pertama dan utama adalah MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) yang dapat mengukur proliferasi dan sitotoksitas senyawa dengan skrining *high-throughput* pada plate 96-well. MTT dapat menembus sel membran, dan akan direduksi pada sel yang viabel oleh mitokondria atau enzim sel plasma, sehingga membentuk formazan yang tidak larut air (Prabst, 2017).

Secara tradisional, viabilitas sel dapat diukur menggunakan trypan blue, terutama pada sel line atau sel primer yang dimurnikan, namun sulit digunakan pada beberapa sel lain seperti sumsum tulang, sel darah tepi mononuclear, atau *whole blood*. Sehingga dikembangkan teknik fluorescence, yang menjadi titik awal perkembangan perhitungan konsentrasi sel secara cepat dan pengukuran viabilitas sel berdasarkan *image-based*, selain dari penggunaan flowcytometri yang membutuhkan sumber daya besar, perawatan yang sulit, dan operator yang terlatih (Chan, 2017). Bahkan sebuah penelitian oleh Olander pada tahun 2017, menyebutkan bahwa *image based* cytometri memiliki hasil yang sama dengan flowcytometri jika dilakukan dengan tahapan-tahapan yang tepat (Olander, 2017).

Flowcytometri masih merupakan alat terbaik untuk identifikasi sel nekrosis dan apoptosis pada satu populasi sel secara simultan / bersamaan. Walaupun biaya flowcytometri cukup

tinggi, namun ada banyak keuntungan yang didapat, seperti jumlah sel yang diperlukan hanya sedikit sehingga dapat menghemat reagen dan waktu yang dibutuhkan (Cummings, 2004).

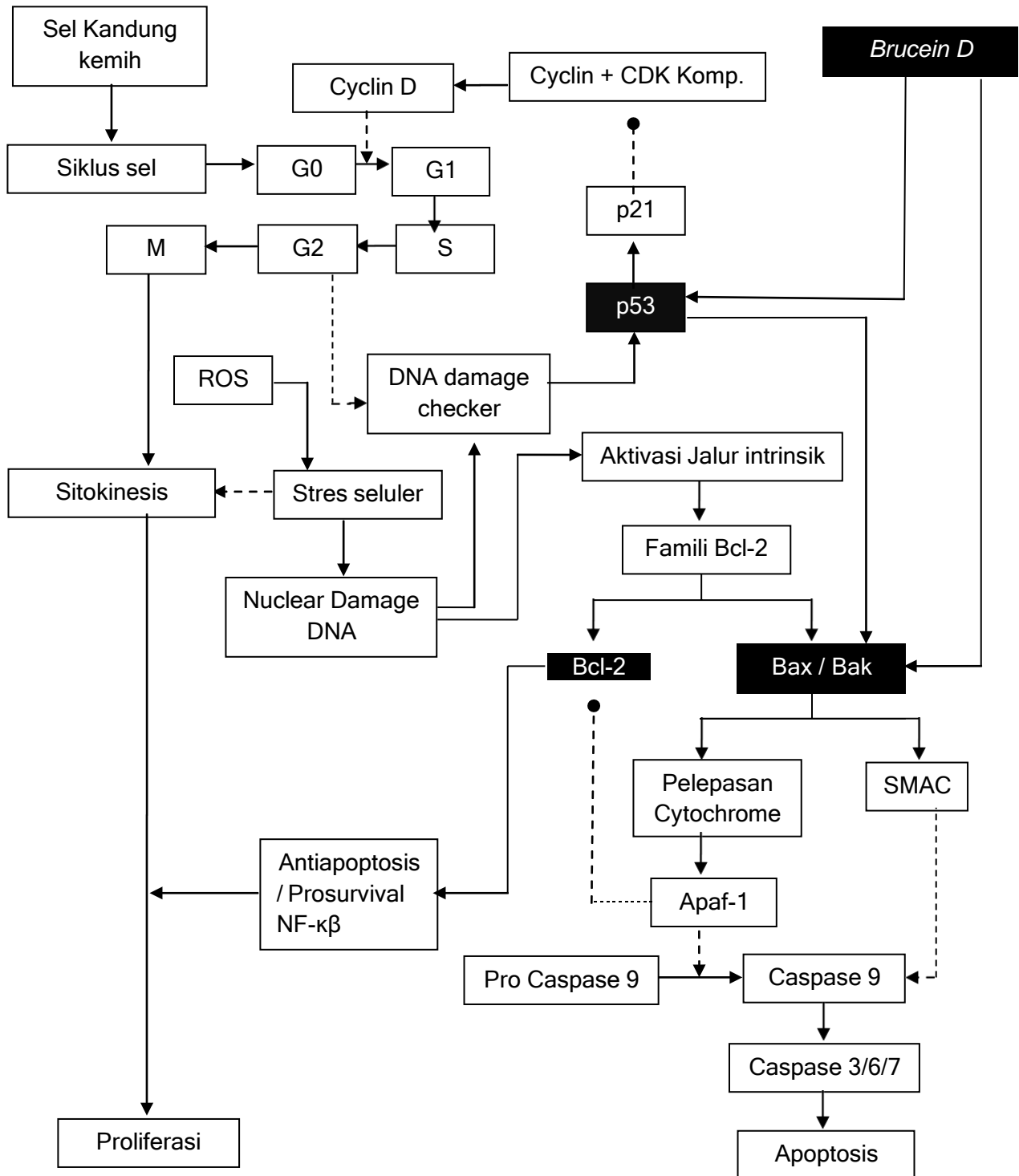
Perubahan morfologi sel yang terjadi pada sel nekrosis dan apoptosis dapat ditentukan dengan pemeriksaan pewarnaan (*staining*) fluoresence dan mikroskop fluoresence. Tiga gambaran khas yang didapatkan adalah kondensasi kromatin, fragmentasi nukleus, dan kondensasi nukleus. Dalam hal ini, kondensasi kromatin atau marginasi kromatin berarti pembentukan kluster / kumpulan kromatin pada sudut atau tepi membran nukleus, sehingga terjadi hilangnya pewarnaan pada sisi nukleus yang lain, dan kondensasi nukleus berarti berkurangnya ukuran nukleus. Kondensasi nukleus dan fragmentasi nukleus dapat terjadi pada apoptosis dan nekrosis, kondensasi nukleus pada apoptosis disebut pyknosis, yang membedakan adalah keutuhan integritas membran nukleus. Sedangkan kondensasi kromatin biasanya khas pada apoptosis. Oleh karena adanya kemiripan dari dua proses ini, biasanya untuk menentukan dengan lebih tepat sel apoptosis atau nekrosis, dilakukan pewarnaan fluoresens ganda (*double staining*) (Cummings, 2004).

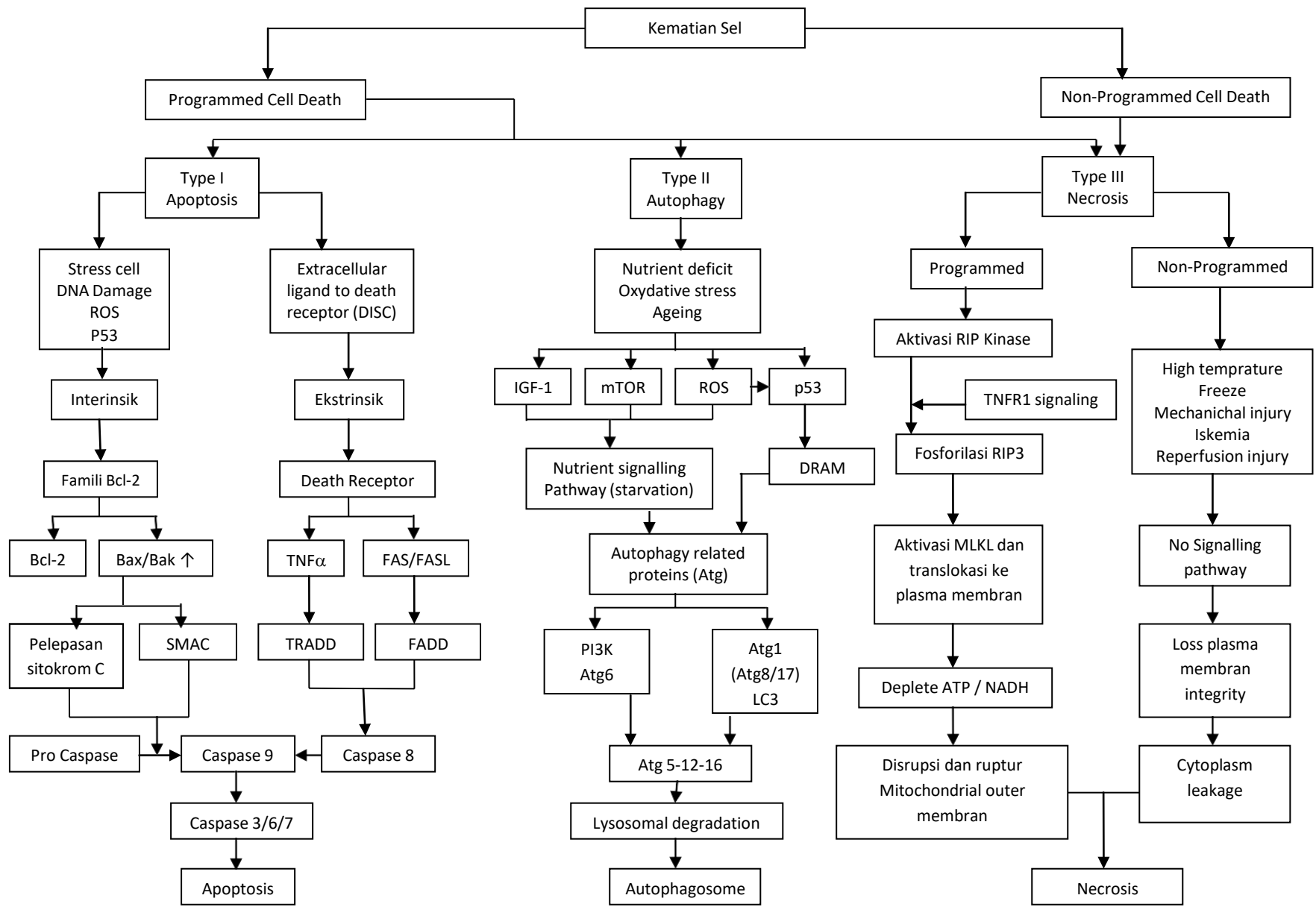
Pemeriksaan morfologi nukleus dapat dilakukan dengan mikroskop fluoresens menggunakan pewarnaan yang *cell-permeable* terhadap inti sel seperti DAPI (4,6-diaminidino-2-

phenylindole) atau Hoechst33342, keduanya lebih disukai karena permeabilitas selnya yang lebih baik dibanding PI pada sel hidup. Namun penggunaan kombinasi DAPI atau Hoechst dengan PI juga sangat baik, karena DAPI dan Hoechst dapat memasuki semua sel, sedangkan PI hanya memasuki sel yang nekrosis atau sel pada fase apoptosis akhir saat keutuhan membran sel sudah hilang. Pada pemeriksaan DAPI dan Hoechst, sel yang menunjukkan morfologi normal dan tidak terwarnai oleh PI merupakan sel sehat, sel yang mengalami fragmentasi nukleus, kondensasi kromatin, dan kondensasi nukleus tanpa terwarnai oleh PI adalah sel apoptosis, sedangkan yang terwarnai oleh PI adalah sel apoptosis pada tahap akhir, dan terakhir sel yang tidak mengalami kondensasi nukleus atau kondensasi kromatin tapi terwarnai oleh PI adalah sel nekrosis. (Mandelkow, 2017, Kntayya, 2018). Perbandingan analisis perhitungan apoptosis dengan Hoechst dan flowcytometri mempunyai keuntungan dan kekurangan masing-masing, namun hasilnya dapat dikatakan setara (Maciorowski, 1998).

H. Kerangka Teori dan Kerangka Konsep

1. Kerangka Teori



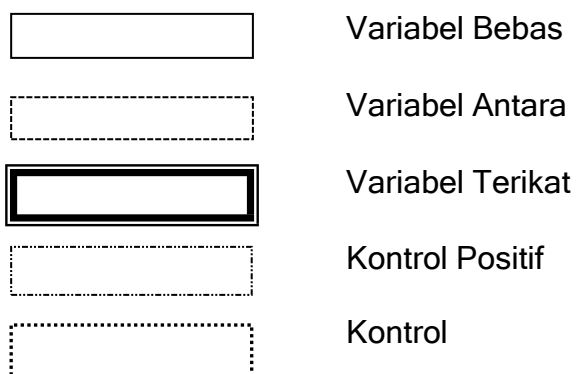
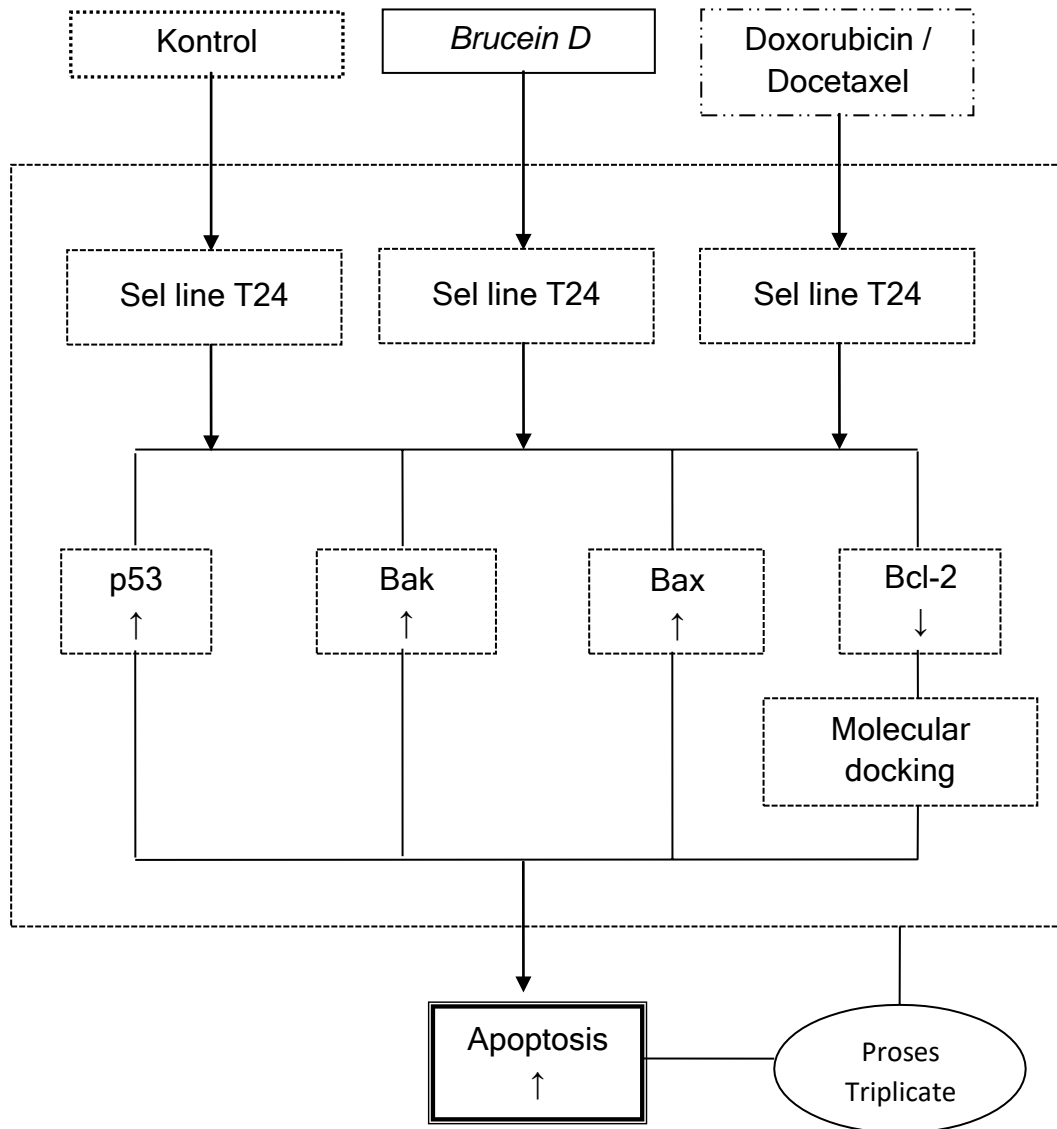


Keterangan :

1. Sel kandung kemih memasuki siklus sel, dari fase istirahat (Gap 0) memasuki Fase interfase pertama (Gap 1), yang merupakan *checkpoint* pertama. Sel dari fase G1 akan mempersiapkan proses transkripsi dan memasuki fase S (sintesis) (Cooper, 2007).
2. Setelah mengalami replikasi DNA pada fase S, sel akan memasuki *checkpoint* kedua yaitu fase Gap 2, dimana sel akan terus tumbuh dan dipersiapkan untuk memasuki fase pembelahan (mitosis).
 - a. Sebelum memasuki fase mitosis, sel harus di cek terhadap adanya kerusakan DNA dalam kromosom.
 - b. Checkpoint G2 ini terutama diregulasi oleh protein tumor p53
 - c. Jika ada kerusakan DNA, p53 yang merupakan tumor supressor gen, akan memperbaiki atau mengaktifasi p21 yang menyebabkan inaktivasi Cyclin – CDK kompleks, sehingga menahan siklus sel di fase G1, tidak memasuki fase sintesis dan menyebabkan hambatan pertumbuhan sel yang akhirnya menuju pada fase apoptosis (Aubrey, 2018)
3. Pada fase M (mitosis), sel eukaryotik membelah kromosom dan inti sel (nucleus) menjadi dua set inti sel yang identik (Cooper, 2007)
4. Fase mitosis kemudian diikuti fase sitokinesis dimana inti sel, sitoplasma, organella, dan membran sel membelah menjadi dua sel yang sama proporsinya, terjadilah proliferasi sel (Cooper, 2007).

5. Jika didapatkan kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, akan terjadi aktivasi proses apoptosis, dimulai dengan aktivasi *BH-3 only protein*, aktivasi faktor-faktor pro-apoptosis Bax/Bak, dan inhibisi faktor-faktor anti-apoptosis Bcl-2/Bcl-XL.
6. Cytochrome C keluar dari mitokondria oleh karena respon terhadap protein Bax/Bak, kemudian berikatan dengan Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor-1*), memecah pro-caspase 9 menjadi caspase 9 (inisiator), dan pada akhirnya memecah pro-caspase 3 menjadi caspase 3 (efektor) yang memulai proses apoptosis, proses ini irreversibel.
7. Selain melalui Apaf-1, proses aktivasi pro-caspase 9 menjadi caspase 9 juga melalui SMAC (*Second Mitochondrial Activator of Caspase*), yang merupakan protein mitokondria yang mengikat IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) seperti NF- κ B, Akt, survivin sehingga menurunkan kemampuan anti-apoptosis dan survival sel.

2. Kerangka Konsep



I. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen p53
2. Pemberian senyawa *Brucein D* dapat menghambat proses anti-apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui hambatan ekspresi gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)
3. Pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bax (*Bcl-2 associated X protein*)
4. Pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginduksi proses apoptosis pada sel kanker kandung kemih T24 melalui peningkatan ekspresi gen Bak (*Bcl-2 homologous killer*)
5. Pemberian senyawa *Brucein D* dapat menginhibisi aktivitas protein Bcl-2 pada Analisis metode penambatan molekuler (*molecular docking*).

J. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas
Pemberian senyawa *Brucein D*

2. Variabel terikat

Mekanisme yang terjadi dalam proses apoptosis sel kanker kandung kemih T24 yang diinduksi oleh pemberian senyawa Brucein D meliputi peningkatan aktivitas ekspresi gen p53, peningkatan aktivitas gen famili Bcl-2 pro-apoptosis, Bak dan Bax, penurunan aktivitas gen Bcl-2 anti-apoptosis, Bcl-2.

K. Definisi Operasional

1. Senyawa *Brucein D*

Merupakan quassinoid aktif dengan susunan molekul $C_{20}H_{26}O_9$, yang diekstraksi dari buah *Brucea javanica*. Pada penelitian ini digunakan tingkat kemurnian 98% menggunakan teknik HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) dengan berat molekul 410,4150 g/mol berbentuk kristal bubuk putih dan telah diidentifikasi menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatograph*) dan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) yang diperoleh dari Aktin Chemichals Inc. (Chengdu, P.R. China) (www.aktinlab.com). Serta sitotoksisitasnya ditentukan dengan MTT Assay dan perhitungan IC_{50} .

2. Sel line karsinoma kandung kemih T24

Merupakan sel epitel kandung kemih yang diambil pada bulan Februari tahun 1970 dari wanita berusia 81 tahun yang menderita kanker kandung kemih selama bertahun-tahun. Secara

histopatologis, merupakan karsinoma sel transisional kandung kemih grade 3, *high grade*, dan invasif, dengan kemampuan memproduksi tumor spesifik antigen (H-ras Onkogen / *Harvey rats sarcoma viral oncogenes*), sel line ini mempunyai kemampuan tumbuh cepat (19 jam), dan dapat merepresentasikan subtype Cyclin D1 yang sangat penting dalam proses apoptosis. () yang dibeli dari *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) dengan nomer Cat-Pack T24/83 ECACC 85061107-1VL (Bubenik, 1973, Santos, 2016)

3. Sel line human normal skin fibroblast 1BR3

Merupakan sel fibroblast normal dari hasil biopsi kulit manusia laki-laki, yang biasa digunakan sebagai kontrol pada sel survival atau mutasi (ECACC 90011801)

4. Apoptosis

Merupakan kematian sel tipe 1 (*Programmed Cell Death*), dengan ciri-ciri morfologis khas. Identifikasi apoptosis dilakukan dengan menggunakan kombinasi pewarnaan fluoresens dengan calcein acetoxymethyl (Calcein-AM) dan propidium iodide (PI) untuk menentukan sel hidup dan sel mati, pewarnaan fluoresens Hoechst 33342 untuk menentukan morfologi sel apoptosis dan kondensasi nukleus, serta gel elektroforesis untuk menentukan fragmentasi DNA nukleus.

5. Gen BCL-2

Merupakan gen regulator protein famili Bcl-2 yang terletak di membran luar mitokondria, dan berperan penting dalam sel survival, ekspresi gen ini menghambat kerja protein pro-apoptosis. Analisis ekspresi gen menggunakan teknik Analisis PCR semi-quantitative dan hasilnya dianalisis dengan program ImageLab (Bagheri, 2018a, Prasedya, 2021)

6. Gen BAK1 (Bak)

Bcl-2 homologous antagonist / killer, merupakan gen regulator protein Bak yang berperan sebagai gen pro-apoptosis dengan meningkatkan pelepasan sitokrom-c, dan menghambat kerja gen anti-apoptosis. Ekspresinya dikode oleh gen BAK1, Analisis ekspresi gen menggunakan RT-PCR dilakukan teknik Analisis PCR semi-quantitative dan hasilnya dianalisis dengan program ImageLab (Bagheri, 2018a, Prasedya, 2021)

7. Gen BAX (Bax)

Bcl-2 associated X protein, yang merupakan gen regulator protein Bax, menginduksi apoptosis melalui peningkatan permeabilitas membran mitokondria sehingga mempermudah pelepasan sitokrom-c. ekspresi gen ini diregulasi oleh p53. Analisis ekspresi gen menggunakan RT-PCR dilakukan dengan teknik Analisis PCR semi-quantitative dan hasilnya dianalisis dengan program ImageLab (Bagheri, 2018a, Prasedya, 2021)

8. Gen p53

Merupakan tumor supressor gen, merupakan gen regulator dari Tumor Protein p53 yang bertugas menjaga genome, berperan sangat penting dalam pencegahan sebagian besar kejadian tumor melalui *DNA repair*, siklus sel *growth arrest*, dan apoptosis. Analisis ekspresi gen menggunakan teknik Analisis PCR semi-quantitative dan hasilnya dianalisis dengan program ImageLab (Bagheri, 2018a, Prasedya, 2021)

9. Penambatan molekuler (*Molecular Docking*)

Disebut juga studi *in silico*, merupakan metode komputasi untuk memprediksi interaksi antar molekul dalam hal ini antara ligand Brucein D terhadap target protein Bcl-2 menggunakan perangkat lunak dengan memperhitungkan sifat mirip obat (*druglikeness*) senyawa Brucein D, derajat energi bebas dari ikatan yang terbentuk, serta konformasi (bentuk) dan visualisasi ikatan yang terbentuk, untuk memperkirakan kemampuan Brucein D melakukan hambatan pada aktivitas anti-apoptosis protein Bcl-2 (Khaerunnisa 2020).