

CHRY SIN MENINGKATKAN EFEK SITOTOKSIK *TNF-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND* TERHADAP SEL HEK293

Habibie

Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

Email : Habibie@unhas.ac.id

ABSTRAK

TNF-related apoptosis-inducing ligand merupakan salah satu pilihan pengobatan kanker yang secara efektif dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi *death receptor* (DR4 dan DR5). Penggunaan *TNF-related apoptosis-inducing ligand* menyebabkan efek samping yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan penggunaan kemoterapi. Namun saat ini beberapa jenis kanker menunjukkan resistensi terhadap *TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Penggunaan *TNF-related apoptosis-inducing ligand* yang dikombinasikan dengan bahan alam menjadi salah satu alternatif untuk mengatasi resistensi yang timbul. Chrysin merupakan flavonoid yang memiliki efek antioksidan dan antikanker. Efek kombinasi *TNF-related apoptosis-inducing ligand* dan chrysin terhadap sel HEK293 ditentukan berdasarkan parameter viabilitas sel menggunakan metode WST-1. Chrysin tidak menyebabkan toksisitas yang besar terhadap sel HEK293 (<20%) namun setelah dikombinasikan dengan *TNF-related apoptosis-inducing ligand* menunjukkan peningkatan efek sitotoksik (41%) dan efek sinergi yang nyata (indeks sinergi = 0,69). Ini menunjukkan bahwa chrysin berpotensi untuk mengatasi resistensi terhadap *TNF-related apoptosis-inducing ligand* khususnya pada sel tumorigenik ginjal.

Kata Kunci : Chrysin, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, Sel HEK293, Sitotoksik

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian selain penyakit kardiovaskular dan infeksi. Prevalensi kanker terus meningkat walaupun telah banyak penemuan baru dalam hal deteksi dini dan metode pengobatan. Hal ini telah meningkatkan kepedulian akan faktor resiko dan penanganan kanker (Jemal et al., 2011). Standar pengobatan kanker saat ini meliputi pembedahan untuk menghilangkan massa tumor yang dilanjutkan dengan radioterapi dan atau

kemoterapi untuk membunuh sel kanker yang tersisa dan mencegah relapse. Namun metode pengobatan tersebut tidak dapat membedakan antara sel normal dan sel kanker menyebabkan efek samping yang berat seperti komplikasi pada saluran pencernaan, hilangnya nafsu makan, kerusakan pada sum-sum tulang belakang, hilangnya berat badan dan nyeri (Feng et al., 2011). Efek samping yang timbul akan mengurangi kualitas hidup dan komplikasi yang timbul akan mempengaruhi prognosis dan

keberhasilan pengobatan pasien (Feng et al., 2011). Oleh karena itu, pengobatan kanker yang ideal harus secara spesifik menarget sel kanker dan tidak mempengaruhi sel normal (Ashkenazi, Holland, & Eckhardt, 2008).

*TNF-related apoptosis-inducing ligand/*TRAIL merupakan bagian dari *TNF super family* yang mampu menginduksi apoptosis melalui aktivasi *death receptor* (DR4 dan DR5). TRAIL dapat secara selektif menginduksi apoptosis pada sel kanker tanpa menyebabkan toksisitas pada sel normal (Walczak et al., 1999; Yamanaka et al., 2000), sehingga penggunaan TRAIL merupakan opsi pengobatan yang lebih aman bagi penderita kanker. Namun, resistensi terhadap TRAIL seringkali timbul sehingga mengurangi efikasinya pada pasien kanker (Keane, Ettenberg, Nau, Russell, & Lipkowitz, 1999). Untuk menanggulangi resistensi yang timbul dan meningkatkan efikasinya, TRAIL dikombinasi dengan senyawa bahan alam atau kemoterapi. Beberapa bahan aktif yang berasal dari tanaman seperti resveratrol (Fulda & Debatin, 2005), berberine (S.-J. Lee et al., 2011) dan curcumin (Andrzejewski et al., 2008) memiliki kemampuan untuk meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap TRAIL.

Chrysin merupakan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai penghambat aromatase (Sanderson et al., 2004), antiinflamasi (Cho et al., 2004) dan antioksidan (Woodman & Chan, 2004).

Chrysin juga memiliki aktivitas menginduksi apoptosis pada beberapa sel kanker (Khoo, Chua, & Balaram, 2010). Efek kombinasi TRAIL dan chrysin terhadap beberapa jenis sel kanker telah dilaporkan sebelumnya (Li et al., 2011) namun informasi lebih detail mengenai hal tersebut terutama pada kanker ginjal masih kurang dan membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Pada penelitian ini ditentukan efektivitas dari kombinasi TRAIL dan chrysin dalam menginduksi kematian sel pada sel HEK293. Sel HEK293 walaupun berasal dari sel embrio ginjal manusia tidak bisa digolongkan sebagai sel normal sebab sel ini telah bersifat immortal dengan *oncogene* yang telah diketahui (Kavsan, Iershov, & Balynska, 2011). *Wild type* HEK293 dilaporkan memiliki aktivitas tumorigenik (Guan, Li, Chen, Liu, & Wang, 2001; Shen et al., 2008). Karakteristik ini ditambah dengan mudahnya ditransfeksi untuk melihat lebih detail mekanisme molekuler yang terjadi membuat sel HEK293 banyak digunakan dalam penelitian kanker.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa Chrysin memiliki efek sitotoksik lemah terhadap sel HEK293 namun setelah dikombinasi dengan TRAIL menunjukkan efek sitotoksik dan sinergi yang baik. Ini menunjukkan bahwa kombinasi chrysin dan TRAIL efektif untuk mengatasi resistensi terhadap TRAIL yang timbul pada sel tumorigenik ginjal.

METODE PENELITIAN

BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian : Sel HEK293, medium DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), penisilin, streptomisin, chrysin (Merck), *Recombinant human TRAIL*, Reagen WST-1 (Dojindo, Jepang), DMSO (Merck).

METODE

Kultur sel: Sel HEK293 dikultur pada medium *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM). Medium tersebut ditambahkan 2 mM L-glutamine, 10% *fetal bovine serum*, 100 units/mL penisillin, dan 100 µg/mL streptomycin. Sel tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5% CO₂.

Pengujian viabilitas Sel HEK293 terhadap TRAIL atau Chrysin: Sel HEK293 ditanam ke dalam multiplate 96 sumuran dengan kepadatan 6 x 10³ sel/sumuran. Setelah diinkubasi selama 24 jam, 10 µL medium yang mengandung *recombinant human TRAIL* atau chrysin dengan konsentrasi tertentu ditambahkan ke dalam *sumuran* dan selanjutnya kembali diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5% CO₂. Setelah 24 jam, *reagent* WST-1 ditambahkan ke setiap *sumuran* diikuti dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate reader*. Kontrol negatif diberikan medium yang mengandung DMSO. Setiap perlakuan dilakukan triplikasi.

Pengujian viabilitas Sel HEK293 terhadap kombinasi TRAIL dan chrysin: Sel HEK293 ditanam ke dalam multiplate 96 sumuran dengan kepadatan 6 x 10³ sel/sumuran. Setelah diinkubasi selama 24 jam, 10 µL medium yang mengandung Chrysin dengan konsentrasi tertentu ditambahkan ke dalam sumuran dan selanjutnya kembali diinkubasi selama 30 menit. Setelah ditambahkan TRAIL dengan konsentrasi tertentu, sel selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5% CO₂. Setelah 24 jam, *reagent* WST-1 ditambahkan ke setiap sumuran diikuti dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate reader*. Kontrol negatif diberikan medium yang mengandung DMSO. Setiap perlakuan dilakukan triplikasi.

Viabilitas sel relatif: Viabilitas sel relatif ditentukan menggunakan persamaan = [rata-rata absorbansi sumuran perlakuan/rata-rata absorbansi sumuran kontrol]

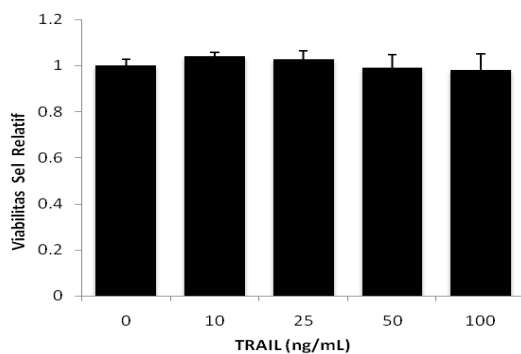
Efek sinergi: Efek sinergi ditentukan ketika viabilitas sel yang diberikan kombinasi TRAIL dan Chrysin (V_{komb}) lebih kecil daripada prediksi efek aditif [viabilitas sel yang diberikan TRAIL (V_{TRAIL}) x viabilitas sel yang diberikan Chrysin (V_{chrysin})]. Indeks sinergi ditentukan menggunakan persamaan = V_{komb}/(V_{TRAIL} x V_{Chrysin}).

HASIL

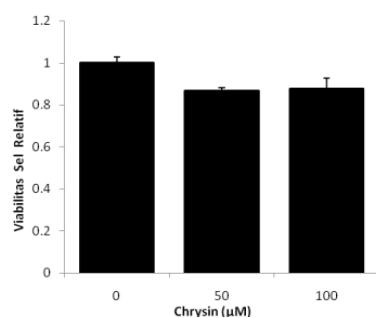
TRAIL dan Chrysin tidak memiliki efek sitotoksik yang nyata terhadap sel HEK293.

TRAIL secara umum tidak menginduksi kematian sel yang nyata pada HEK293. Pada konsentrasi 100 ng/mL (konsentrasi tertinggi yang digunakan) viabilitas sel relatif sebesar 0.97 (gambar 1A). Chrysin menunjukkan efek sitotoksik ringan pada sel HEK293 (<20%). Pada konsentrasi 100 μ M viabilitas sel relatif sel HEK293 masih berada pada kisaran 0.87 (gambar 1B).

A



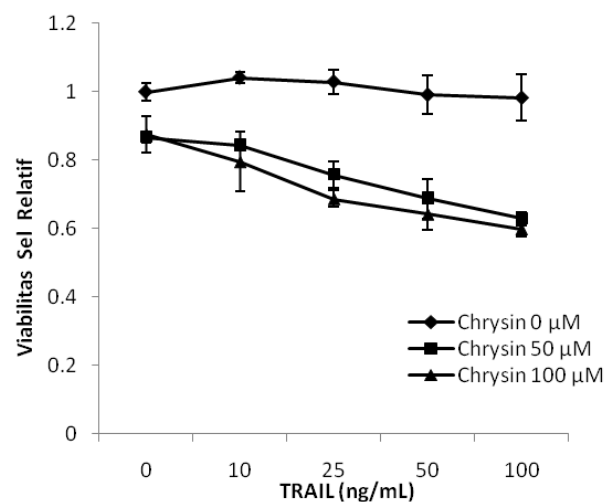
B



Gambar 1. Efek TRAIL dan Chrysin terhadap viabilitas sel HEK293. **(A)** Pengujian efek TRAIL terhadap viabilitas sel HEK293. Sel diberikan TRAIL dengan beberapa variasi konsentrasi dan diinkubasi selama 24 Jam. **(B)** Pengujian efek Chrysin terhadap viabilitas sel HEK293. Sel diberikan Chrysin dengan beberapa variasi konsentrasi dan diinkubasi selama 24 Jam.

Kombinasi Chrysin dan TRAIL secara sinergi menginduksi sitotoksik pada sel HEK293.

TRAIL dan Chrysin apabila diberikan secara terpisah tidak memberikan efek sitotoksik yang nyata pada Sel HEK293 (gambar 1A dan 1B). Namun, setelah dikombinasi menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik. Pada pemberian Chrysin 100 μ M dan setelah inkubasi 30 menit dilanjutkan dengan penambahan TRAIL 100 ng/mL, viabilitas sel relatif HEK293 mengalami penurunan dari 0,87 ke 0,59 (sitotoksitas meningkat 28%) (gambar 2).



Gambar 2. Efek kombinasi TRAIL dan Chrysin terhadap viabilitas sel HEK293. Sel diberikan Chrysin dengan beberapa variasi konsentrasi lalu diinkubasi selama 30 menit, selanjutnya diberikan TRAIL dengan konsentrasi tertentu. Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam.

Peningkatan efek sitotoksik yang timbul merupakan hasil dari efek sinergi antara TRAIL dan chrysin. Hal ini terlihat dari viabilitas sel relatif kombinasi (Vkomb) yang lebih kecil daripada prediksi

efek aditif ($0,59 < 0,85$) dan setelah dilakukan perhitungan lebih lanjut diperoleh indeks sinergi TRAIL (100 ng/mL) dan chrysin (100 μ M) sebesar 0,69 (berefek sinergi apabila indeks sinergi < 1) (tabel 1).

Tabel 1. Viabilitas sel relatif, Prediksi efek aditif dan Indeks sinergi kombinasi Chrysin dan TRAIL.

Chrysin (μ M)	HEK293		Prediksi Efek aditif	Indeks Sinergi
	TRAIL 100 ng/mL			
	(-)	(+)		
	1	0,98		
50	0,86	0,62	0,84	0,73
100	0,87	0,59	0,85	0,69

PEMBAHASAN

Induksi apoptosis melalui aktivasi reseptor TRAIL (DR4 dan DR5) merupakan salah satu pilihan dalam terapi pengobatan kanker tetapi seperti halnya agen kemoterapeutik yang lain, TRAIL menghadapi permasalahan yang sama yaitu timbulnya resistensi. Salah satu strategi yang efektif untuk mengatasi hal tersebut adalah mengkombinasikan TRAIL dengan anti kanker lainnya (Zhang & Fang, 2005). Beberapa senyawa kimia telah diidentifikasi efektif dalam meningkatkan kemampuan TRAIL menginduksi kematian sel (apoptosis) dimana beberapa diantaranya berasal dari bahan alam (Fulda & Debatin, 2005; Keane et al., 1999; S.-J. Lee et al., 2011; Shi, Ong, & Shen, 2005).

Flavonoid merupakan salah satu golongan bahan alam yang banyak digunakan untuk pengobatan dan

pengecahan penyakit degeneratif termasuk kanker. Beberapa senyawa flavonoid dilaporkan dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap obat-obat kemoterapi sehingga meningkatkan efikasinya (He et al., 2012; E. Lee et al., 2007; Scambia et al., 1990). Chrysin merupakan salah satu golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker. Chrysin menghambat pertumbuhan dan menginduksi apoptosis pada beberapa jenis sel kanker seperti kanker kolon, kanker prostat, glioma dan kanker payudara (Parajuli, Joshee, Rimando, Mittal, & Yadav, 2009; Wang et al., 2004). Efek kombinasi TRAIL dan chrysin terhadap beberapa jenis sel kanker telah dilaporkan sebelumnya (Li et al., 2011) namun informasi lebih detail mengenai hal tersebut terutama pada kanker ginjal masih kurang.

Dalam penelitian ini kombinasi chrysin dan TRAIL diujikan pada sel HEK293. Sel HEK293 merupakan sel yang paling banyak nomor dua digunakan dalam penelitian biologi setelah sel HeLa (Lin et al., 2014). Hal ini salah satunya disebabkan mudahnya untuk dilakukan modifikasi genetik pada sel ini melalui transfeksi sehingga sangat membantu untuk memahami lebih jauh mekanisme molekuler yang terjadi. Di bidang penelitian kanker sel HEK293 sering digunakan untuk melihat efek dari senyawa anti kanker walaupun sel ini berasal dari sel embrio ginjal manusia. Hal ini disebabkan oleh karakteristik yang

membuatnya tidak digolongkan sebagai sel normal. Sel ini telah bersifat immortal dengan *oncogene* yang telah diketahui (Kavsan et al., 2011). *Wild type* HEK293 dilaporkan memiliki aktivitas tumorigenik (Guan et al., 2001; Shen et al., 2008).

Efek sitotoksik pada Sel HEK293 diukur menggunakan metode WST-1. Aktivitas sitotoksik ditentukan dengan menggunakan parameter viabilitas sel relatif yang perhitungannya mengikuti persamaan berikut: Viabilitas sel relatif = [rata-rata absorban sumuran perlakuan/rata-rata absorban sumuran kontrol]. Hasil penelitian menunjukkan baik TRAIL maupun chrysin secara terpisah tidak mampu menginduksi sitotoksik yang nyata pada sel HEK293 (gambar 1). Sebaliknya kombinasi TRAIL (100 ng/mL) dan chrysin (100 µM) meningkatkan efek sitotoksik yang timbul pada sel HEK293 (41%) dengan indeks sinergi 0,69 (berefek sinergi apabila indeks sinergi <1) (gambar 2 dan tabel 1).

Hasil ini memberikan kesempatan untuk mengetahui lebih jauh mekanisme molekuler dari efek sitotoksik yang timbul dari kombinasi TRAIL dan chrysin terutama pada kanker ginjal. Penelitian selanjutnya dapat menggunakan sel HEK293 atau sel kanker ginjal dengan melihat ekspresi protein tertentu atau modifikasi genetika untuk menentukan hal tersebut. Beberapa hipotesis dapat diajukan mengenai mekanisme yang mungkin timbul dari kombinasi tersebut. Kombinasi TRAIL dan chrysin

kemungkinan meningkatkan ekspresi (jumlah) dari *death receptor* (DR4 dan DR5) di permukaan sel HEK293 sebagaimana yang terjadi pada kombinasi etoposide dan TRAIL (Gibson, Oyer, Spalding, Anderson, & Johnson, 2000). Kombinasi TRAIL dan chrysin dapat juga menurunkan ekspresi antiapoptotik protein atau meningkatkan jumlah proapoptotik protein sehingga meningkatkan sensitivitas sel HEK293 terhadap apoptosis sebagaimana yang terjadi pada kombinasi wogonin dan TRAIL (Fas et al., 2006; He et al., 2012). Disamping kedua hipotesis diatas masih banyak kemungkinan mekanisme yang mungkin terjadi untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memastikannya.

KEPUSTAKAAN

- Andrzejewski, T., Deeb, D., Gao, X., Danyluk, A., Arbab, A. S., Dulchavsky, S. A., & Gautam, S.C. Therapeutic efficacy of curcumin/TRAIL combination regimen for hormone-refractory prostate cancer. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 17(6), 257-267. 2008
- Ashkenazi, A., Holland, P., & Eckhardt, S. G. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology*, 26(21), 3621-3630. 2008
- Cho, H., Yun, C.-W., Park, W.-K., Kong, J.-Y., Kim, K. S., Park, Y., Kim, B.-K. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and

- iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacological Research*, 49(1), 37-43. 2004
- Fas, S. C., Baumann, S., Zhu, J. Y., Giaisi, M., Treiber, M. K., Mahlknecht, U., Li-Weber, M. Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF α -and TRAIL-induced apoptosis. *Blood*, 108(12), 3700-3706. 2006
- Feng, Y., Wang, N., Zhu, M., Feng, Y., Li, H., & Tsao, S. Recent progress on anticancer candidates in patents of herbal medicinal products. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 3(1), 30-48. 2011
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *European Journal of Cancer*, 41(5), 786-798. 2005
- Gibson, S. B., Oyer, R., Spalding, A. C., Anderson, S. M., & Johnson, G. L. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Molecular and cellular biology*, 20(1), 205-212. 2000
- Guan, L. S., Li, G. C., Chen, C. C., Liu, L. Q., & Wang, Z. Y. Rb-associated protein 46 (RbAp46) suppresses the tumorigenicity of adenovirus-transformed human embryonic kidney 293 cells. *International journal of cancer*, 93(3), 333-338. 2001
- He, F., Wang, Q., Zheng, X.-L., Yan, J.-Q., Yang, L., Sun, H., Wang, X. Wogonin potentiates cisplatin-induced cancer cell apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Oncology reports*, 28(2), 601-605. 2012
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90. 2011
- Kavsan, V. M., Iershov, A. V., & Balynska, O. V. Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation. *BMC cell biology*, 12(1), 23. 2011
- Keane, M. M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., Russell, E. K., & Lipkowitz, S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer research*, 59(3), 734-741. 1999
- Khoo, B. Y., Chua, S. L., & Balaram, P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2188-2199. 2010
- Lee, E., Enomoto, R., Suzuki, C., Ohno, M., Ohashi, T., Miyauchi, A., Yokoi, T. Wogonin, a Plant Flavone, Potentiates Etoposide-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095(1), 521-526. 2007
- Lee, S.-J., Noh, H.-J., Sung, E.-G., Song, I.-H., Kim, J.-Y., Kwon, T. K., & Lee, T.-J. Berberine sensitizes TRAIL-induced apoptosis through proteasome-mediated downregulation of c-FLIP and Mcl-1 proteins. *International journal of oncology*, 38(2), 485. 2011
- Li, X., Wang, J.-N., Huang, J.-M., Xiong, X.-K., Chen, M.-F., Ong, C.-N., Yang, X.-F. Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. *Toxicology in vitro*, 25(3), 630-635. 2011
- Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Drmanac, R. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to

- cell biology manipulations. *Nature communications*, 5, 4767. 2014
- Parajuli, P., Joshee, N., Rimando, A. M., Mittal, S., & Yadav, A. K. In vitro antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta medica*, 75(01), 41-48. 2009
- Sanderson, J. T., Hordijk, J., Denison, M. S., Springsteel, M. F., Nantz, M. H., & Van Den Berg, M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences*, 82(1), 70-79. 2004
- Scambia, G., Ranelletti, F., Panici, P. B., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Piantelli, M., & Mancuso, S. Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth. *Anti-cancer drugs*, 1(1), 45-48. 1990
- Shen, C., Gu, M., Song, C., Miao, L., Hu, L., Liang, D., & Zheng, C. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro. *Biologicals*, 36(4), 263-268. 2008
- Shi, R.-X., Ong, C.-N., & Shen, H.-M. Protein kinase c inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer research*, 65(17), 7815-7823. 2005
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Le, T. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*, 5(2), 157-163. 1999
- Wang, W., VanAlstyne, P. C., Irons, K. A., Chen, S., Stewart, J. W., & Birt, D. F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutrition and cancer*, 48(1), 106-114. 2004
- Woodman, O. L., & Chan, E. C. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(11), 786-790. 2004
- Yamanaka, T., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Fujikawa, K., Ito, M., Suzuki, A. Chemotherapeutic Agents Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Hepatology*, 32(3), 482-490. 2000
- Zhang, L., & Fang, B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*, 12(3), 228-237. 2005