

Benzapyren Menginduksi Apoptosis Sel Paru pada *Ratus norvegicus***Benzopyrene Induce Apoptosis of the Lung Cells in *Ratus norvegicus***¹Muhamad Agus Wibowo, ²Sofwan Anwari, ³Aulanni'am¹Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura²Fakultas Kehutanan, Universitas Tanjungpura³Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

Jl. Veteran, Malang

Telp. 0341 575838

Email: aguso2@yahoo.com

Abstract

Apoptosis is importen in physiologic and pathologic processes such as tumor regression, embryogenesis, and normal cell turnover. ROS is molecule that importen to induce DNA damage and apoptosis of cell. Increasing of ROS expression can be induce by carcinogenic compounds as benzopyrene. This research have been tested of inducing apoptosis by benzopyren that mediated by ROS. The data of research indicating that benzopyrene can increasing apoptosis of lung cells and increasing of ROS. Base on the data of this research, we understood that benzopyrene can induce apoptosis of lung cells by ROS path ways.

Keywords : Benzopyrene, Apoptosis, ROS**Pendahuluan**

Apoptosis atau kematian sel terprogram adalah suatu mekanisme kontrol yang mendorong sel mengalami kematian sebagai akibat adanya kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki. Apoptosis juga penting dalam mengontrol jumlah sel dan proliferasi sebagai bagian dari pertumbuhan yang normal (Ghobrial *et al.*, 2005). Mekanisme sel dalam menjalani apoptosis melibatkan teraktivkannya gen p53, caspase, dan protein-protein proapoptosis (Los & Walczak, 2002; Ghobrial *et al.*, 2005). Adanya disregulasi apoptosis pada beberapa sel yang mengalami kerusakan DNA akan berakibat pada tingginya resiko terjadinya kanker (Janne *et al.*, 2005; Karakas *et al.*, 2006; Riely *et al.*, 2009).

Reactive oxygen species (ROS) merupakan molekul yang dihasilkan akibat adanya respon dari kerusakan jaringan akibat berbagai macam penyakit dan senyawa karsinogen (Sugiyama *et al.*, 1996). Beberapa peneliti menyebutkan bahwa molekul ini berperan dalam menginduksi terjadinya apoptosis pada berbagai macam jenis sel (Sugiyama *et al.*, 1996). Kemampuan ROS dalam menginduksi terjadinya apoptosis karena mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA (Palackal, N.T., 2002; Belous, A.R., 2007; Ariese, F., 1996; Leavitt, S.A., 2008). Adanya kerusakan DNA akan mengakibatkan terakumulasinya gen p53. Gen p53 akan mengtifkan gen p21 yang berakibat terhentinya siklus sel. Gen p53 juga mengaktifkan PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) dan Bax sehingga diregulasi terjadinya apoptosis (Yu *et al.*, 2003).

Benzapyren merupakan salah satu senyawa mayor dalam asap rokok yang dapat menginduksi

terjadinya kanker paru (Lin *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2007). Kemampuan benzapyren dalam menginduksi terjadinya kanker paru karena benzapyren mampu menginduksi terjadinya peningkatan ROS (Ji & Shen, 2008). ROS akan mengoksidasi DNA sehingga mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA yang diikuti mutasi genetik pada gen-gen vital pengontrol siklus sel sehingga sel-sel paru didorong untuk berproliferasi dan menekan terjadinya apoptosis (Ambs *et al.*, 1997; Palackal, N.T., 2002; Belous, A.R., 2007; Ariese, F., 1996; Leavitt, S.A., 2008).

Induksi benzapyrene juga berpotensi mendorong diregulasinya apoptosis pada sel-sel paru yang terpapar benzapyrene secara in-vivo. Hal ini didasari kenyataan bahwa adanya paparan benzapyren akan meningkatkan produksi ROS dan meningkatkan terjadinya kerusakan DNA (Ji & Shen, 2008). Beberapa penelitian juga menunjukkan adanya kemampuan benzapyren dalam menginduksi apoptosis sel-sel coba secara in-vitro (Kim *et al.*, 2007).

Materi dan Metoda Penelitian

Uji secara in-vivo. Dipilih tikus putih (*Ratus norvegicus*) jantan galur Wistar yang berumur 2-3 bulan dengan kisaran berat badan 200-250 gram dan diadaptasi selama 7 hari. Hewan percobaan dikelompokkan menjadi 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok T0 (tikus kontrol sehat) dan T1 (tikus terpapar benzapyren). Kelompok T0 adalah klompok hewan coba sehat (tanpa perlakuan), tikus hanya diberi akuades. Kelompok hewan coba T1 dipapar benzapyren (B1760) secara intraperitoneal dengan doses 200mg/kg berat badan selama 4 kali berselang 1 hari dan diinkubasi selama 30 hari. Pada akhir

perlakuan, semua tikus percobaan dikorbankan secara secara *dislocatio cervicalis*, lalu dibedah bagian dada dan dilakukan koleksi organ paru.

Pengukuran Malondialdehyde (MDA). Dibuat homogen terhadap 0,45 g jaringan paru dan di tambah terhadapnya 1mL NaCl dingin 0,9%, dihomogenkan, dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit hingga diperoleh supernatan. Terhadap supernatan yang diperoleh selanjutnya diambil sebanyak 100 μ L dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kecil dan ditambahkan secara berturut-turut 550 μ L aquades, 100 μ L TCA (trichloroacetic acid) kemudian dihomogenkan. Kedalam campuran selanjutnya ditambah 250 μ L HCl dan 100 μ L Na-thiobarbiturat dan selanjutnya dihomogenkan. Setelah campuran homogen maka selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit hingga diperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh kemudiandinkubasi dalam penangas air pada suhu 100°C selama 30 menit. Hasil yang diperoleh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit hingga diperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ_{maks} = 533 nm).

Uji Apoptosis. Terhadap organ paru yang diperoleh dibuat preparat histologis dengan ketebalan pemotongan 6 μ yang diikuti dengan pemeriksaan adanya apoptosis secara immunohistokimia menggunakan pewarnaan TUNEL, dengan menggunakan kit Apo-BrdU-IHC (K403-50). Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Adanya peristiwa apoptosis dari sel-sel paru ditandai dengan terbentuknya warna coklat, yang menandakan terjadinya fragmentasi DNA.

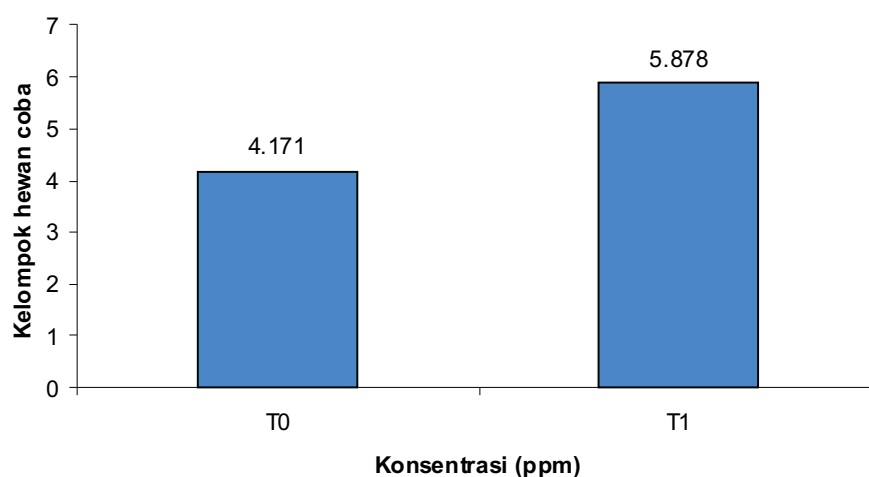
Analisis data. Hasil pengamatan mikroskopis jaringan paru dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan antara kedua kelompok perlakuan tikus: T0 (tikus kontrol sehat) dan T1 (tikus perlakuan benzapyren).

Hasil dan Pembahasan

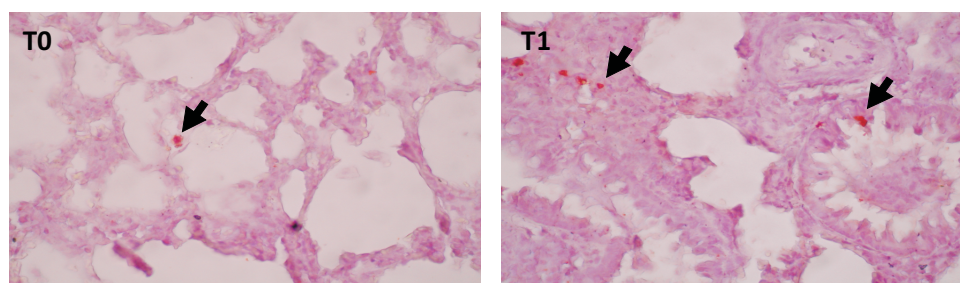
Pada pengukuran konsentrasi malondialdehyde (MDA) diperoleh data seperti terlihat pada gambar 1. Hasil uji MDA pada organ paru menunjukkan bahwa hewan coba yang diinduksi dengan bensapiren secara intraperitoneal (T1) memiliki kadar MDA lebih besar dibandingkan dengan hewan coba kontrol (T0). Hal ini terjadi karena benzapyren yang masuk ke jaringan paru akan mengalami reaksi oksidasi yang terkatalisis oleh enzim-enzim CYPs (*cytochrome* P450s) menjadi BP-7,8-epoxide; BP-7,8-diol ((-)-benzapyrene-7,8-diol); BPDE ((-)benzapyrene-r-7,t-8-dihidrodiol t-9,10-epoxide); dan radikal kation (Shimada, T., 2006). Dimana molekul-molekul tersebut mendorong meningkatnya ROS yang ditandai dengan meningkatnya kadar MDA dalam organ paru.

Analisis apoptosis sel-sel paru akibat paparan benzapyren dengan menggunakan pewarnaan TUNEL memberikan hasil seperti terlihat pada gambar 2 dan gambar 3. Hasil pada gambar 2. memperlihatkan bahwa akibat pemberian benzapyren meningkatkan terjadinya apoptosis dari sel-sel organ paru, yang ditandai dengan terbentuknya noda warna coklat. Dengan mengkuantisasikan hasil analisis didapat data indek apoptosis seperti terlihat pada gambar 3. data indek apoptosis menunjukkan bahwa akibat paparan benzapyren meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel-sel paru, hal ini bisa dilihat bahwa pada hewan coba kelompok T1 (tikus terpapar benzapyren) memiliki indek apoptosis sebesar 7 sedangkan pada kelompok T0 (tikus control) memiliki indek apoptosis sebesar 3.

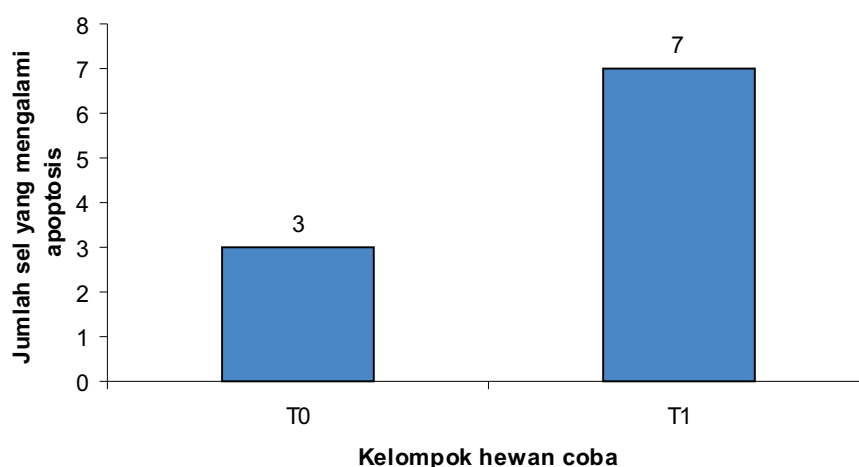
Hasil yang terdapat pada Gambar 3 menunjukkan bahwa paparan benzapyren terhadap hewan coba secara intraperitoneal mengakibatkan terjadinya peningkatan apoptosis pada sel-sel paru. Peningkatan apoptosis sel-sel paru yang terjadi akibat paparan benzapyren berkorelasi positif dengan meningkatnya ROS jaringan paru. Hal ini terjadi karena adanya paparan benzapiren yang masuk



Gambar 1. Grafik konsentrasi MDA masing-masing kelompok hewan coba



Gambar 2. Apoptosis sel-sel paru pada hewan coba menggunakan pewarnaan TUNEL (400x).



Gambar 3. Grafik indeks apoptosis kelompok hewan coba

kedalam tubuh akan mengaktifkan AhR. AhR yang teraktifasi akan membentuk kompleks dengan ARNT (AhR nuclear translocator) dan DRE (dioxine response elements) untuk selanjutnya mengaktifkan RNapol II (RNA poliymerase II) untuk mensintesis mRNA yang selanjutnya akan diproduksi CYP1A1 (cytochrome P450 1A1) dan CYP1B1 (cytochrome P450 1B1) yang berfungsi mengoksidasi dari senyawa bensapiren (Sissung., 2006; Xu, 2005; Nakata, 2006; Magesh, 2007; Aklillu, 2005; Kushman, 2007; Wenzlaff, 2005).

Dengan dirilisnya CYP1A1 dan CYP1B1, benzapiren akan reaksi oksidasi menjadi BP-7,8-epoxide; BP-7,8-diol ((-)-benzapyrene-7,8-diol); BPDE ((benzapyrene-r-7,t-8-dihidrodiol t-9,10-epoxide); dan radikal kation (Shimada, 2006). Spesies BP-7,8-epoxide; BP-7,8-diol; BPDE dan radikal kation, sehingga meningkatkan produksi ROS dalam organ paru. Meningkatnya produksi ROS akan mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA (DNA damage) (Palackal *et al.*, 2002; Belous *et al.*, 2007; Ariese *et al.*, 1996; Leavitt *et al.*, 2008). Adanya kerusakan DNA akan mengakibatkan diregulasinya apoptosis dari sel-sel paru baik secara internal melalui aktivasi gen p53 maupun secara eksternal melalui jalur induksi Fas/FasL.

Kesimpulan

Dari hasil pembahasan pada penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa paparan benzapiren terhadap jaringan paru dapat meningkatkan terjadinya apoptosis sel-paru tikus putih *Ratus norvegicus* melalui jalur ROS menginduksi apoptosis.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini lewat hibah Penelitian Hibah Bersaing (PHB) tahun anggaran 2008/2009 dengan nomor kontrak: 152b/H22.9/PL/2009 tanggal 15 April 2009.

Daftar Pustaka

- Aklillu, E., S. Øvrebø, I.V. Botnen, C. Otter, & M. Ingelman-Sundberg, 2005, Characterization of Common CYP1B1 Variants with Different Capacity for Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol Epoxide Formation from Benzo[a]pyrene, *Cancer Res*, 65(12): 5105-5111.
- Ambs, S., S.F. Hussain, C.C. Harris, 1997, Interactive Effects of Nitric Oxide and the p53 Tumor Suppressor Gene in Carcinogenesis and Tumor Progression, *FASEB J.*, 11: 443-448.

- Aoki, Y., A.H. Hashimoto, K. Amanuma, M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, T. Nohmi, & M. Yamamoto, 2007. Enhanced Spontaneous and Benzo(a)pyrene-Induced Mutations in the Lung of Nrf2-Deficient *gpt* Delta Mice, *Cancer Res*, 67(12): 5643–5648.
- Ariese, F., G.J.Small & R.Jankowiak, 1996, Conformational studies of depurinating DNA adducts from syn-dibenzo[a,r]pyrene di-epoxide, *Carcinogenesis*, 17(4): 829-837.
- Belous, A.R., D.L. Hachey, S. Dawling, N. Roodi, & F.F. Parl, 2007, Cytochrome P450 1B1-Mediated Estrogen Metabolism Results in Estrogen-Deoxyribonucleoside Adduct Formation, *Cancer Res*, 67(2):812–817.
- Ghobrial, I.M., T.E. Witzig, A.A. Adjei, 2005, Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA Cancer J. Clin.*, 55: 178-194
- Holme, J.A., M. Gorria, V.M. Arlt, S. Ovrebo, A. Solhaug, X. Tekpli, N.E. Landvik, L. Huc, O. Fardel, & D. Lagadic-Gossmann, 2007, Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepalcl7 cells, *Chem. Biol. Interact.*, 167(1): 41-55
- Janne, P.A., J.A. Engelman, & B.E. Johnson, 2005. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Implications for Treatment and Tumor Biology, *J. Clin. Oncol.*, 23: 3227-3234.
- Ji, H-F. & L. Shen, 2008, Mechanisms of reactive oxygen species photogeneration by benzo[a]pyrene: A DFT study, *THEOCHEM*, 893: 6-8.
- Karakas, B., K.E. Bachman, & B.H. Park, 2006. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers, *British J. Cancer*, 94: 455 – 459.
- Kim, J.Y., J-Y. Chung, J-E. Park, S.G. Lee, Y-J. Kim, M-S. Cha, M.S. Han, H-J. Lee, Y.H. Yoo, & J-M. Kim, 2007, Benzopyrene Induces Apoptosis in RL95-2 Human Endometrial Cancer Cells by Cytochrome P450 1A1 Activation, *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2007-0096
- Kushman, M.E., S.L. Kabler, M.H. Fleming, S. Ravoori, R.C. Gupta, J. Doehmer, C. S. Morrow, & A.J. Townsend, 2007, Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1, *Carcinogenesis*, 28(1): 207–214
- Leavitt, S.A., M.H. George, T. Moore & J.A. Ross, 2008, Mutations induced by benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene in lacI transgenic B6C3F1 mouse lung result from stable DNA adducts, *Mutagenesis*, 23(6): 445–450.
- Lin, P., H. Chang, W-T. Tsai, M-S. Wu, Y-S. Liao, J-T. Chen, & J-M. Su, 2003a. Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas, *Toxicologic Pathology*, 31(22): 22-30
- Los, M. & H. Walczak, 2002, Caspases- The Role in Cell Death and Cell Survival, Kluwe Academic/ Plenum Publishers, New York.
- Magesh, V., R. Venugopal, K.D. Bhavani, & D. Sakthisekaran, 2007; Effect of Crocetin on Benzo(a) Pyrene Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice, *Int. J. Cancer Res.*, 3(3): 143-150
- Nakata, K., Y. Tanaka, T. Nakano, T. Adachi, H. Tanaka, T. Kaminuma, & T. Ishikawa, 2006, Nuclear Receptor-Mediated Transcriptional Regulation in Phase I, II, and III Xenobiotic Metabolizing Systems, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21(6): 437-457.
- Palackal, N.T., S.H. Lee, R.G. Harvey, I.A. Blair, T.M. Penning, 2002, Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *trans*-Dihydrodiol Proximate Carcinogens by Human Aldo-keto Reductase (AKR1C) Enzymes and Their Functional Overexpression in Human Lung Carcinoma (A549) Cells, *J. Bio. Chem.*, 277(27): 24799–24808.
- Riely, G.J., J. Marks, & W. Pao, 2009. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 6: 201–205.
- Shimada, T., 2006, Xenobiotic-Metabolizing Enzymes involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21(4): 257-276.
- Sissung, T.M., D.K. Price, A. Sparreboom, and W.D. Figg, 2006, Pharmacogenetics and Regulation of Human Cytochrome P450 1B1: Implications in Hormone-Mediated Tumor Metabolism and a Novel Target for Therapeutic Intervention, *Mol Cancer Res*, 4(3): 135–150
- Sugiyama, H. N. Kashihara, H. Makino, Y. Yamasaki, & Zensuke Ota, 1996, Reactive Oxygen Species Induce Apoptosis in Cultured Human Mesangial Cells, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7: 2357-2363
- Wenzlaff, A.S., M.L. Cote, C.H. Bock, S.J. Land, S.K. Santer, D.R. Schwartz & A.G. Schwartz, 2005, CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study, *Carcinogenesis*, 26(12): 2207–2212.
- Xu, C., C.Y-T. Li, & A-N.T. Kong, 2005, Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics, *Arch Pharm Res*, 28(3): 249-268
- Yu, J., Z. Wang, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, & L. Zhang, 2003, PUMA Mediates the Apoptotic Response to p53 in Colorectal Cancer Cells, *PNAS*, 100(4): 1931–1936.