Terfenadine Meningkatkan Aktifitas Caspase-9 pada Kultur Sel Melanoma Maligna

Terfenadine Increase Caspase-9 Activity in Malignant Melanoma Cell Culture

Sjafrida, Elfina G Sadono

Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Pencarian agen anti kanker baru pada melanoma maligna yang lebih selektif merupakan prioritas utama. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian *terfenadine* terhadap aktifitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 dan hubungan antara perubahan dosis *terfenadine* dengan perubahan aktivitas *caspase-9*. Penelitian ini merupakan analitik eksperimental pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 yang dipapar dengan *terfenadine*. Kultur *cell line* melanoma maligna dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol, kultur+5 μM *terfenadine*, kultur+10 μM *terfenadine*, kultur+25 μM *terfenadine*, kultur+40 μM *terfenadine*. Spesimen diinkubasi selama 8 jam lalu dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi *caspase-9*. Aktivitas *caspase-9* diamati dengan mikroskop okular dengan pembesaran 1000x, sel-sel aktivitas *caspase-9* ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel dengan *counter stain* warna biru. Data hasil pengamatan dilakukan analisa statistik dengan uji ANOVA, uji *Tukey*, uji korelasi dan regresi. Terdapat perbedaan efek *terfenadine* pada setiap perlakuan terhadap aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 ($p < 0,001$). Korelasi pemberian *terfenadine* dengan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 ($r = 0,844$; $p = 0,000$) mempunyai korelasi positif yang signifikan. Pemberian *terfenadine* berpengaruh dalam meningkatkan aktifitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872.

Kata Kunci: Apoptosis, *caspase-9*, melanoma maligna, *terfenadine*

ABSTRACT

This reserach aim to determine the effect of terfenadine on caspase-9 activity in malignant melanoma CRL 1872 cell line culture and examined the relation between terfenadine doses and caspase-9 activity. An experimental study was performed using malignant melanoma CRL 1872 cell line culture exposed to terfenadine. The malignant melanoma cell culture was divided in 6 groups which are: control group, 2. cell culture+5 μM terfenadine, 3. cell culture+10 μM terfenadine, 4. cell culture+25 μM terfenadine, 5. cell culture+40 μM terfenadine. All groups were incubated for 8 hours and immunoflourescence assay were performed with caspase-9 antibody. The caspase-9 activity were viewed and analyzed with 1000x magnification ocular microscope. The cells of caspase-9 activity were shown as brown nuclear with blue counter stain. There were significant differences caspase-9 activity in each terfenadine dosage ($p = 0,000$). There were significant correlation between terfenadine doses and caspase-9 activity in malignant melanoma cell line culture CRL 1872 ($r = 0,844$, $p = 0,000$). Terfenadine stimulated caspase-9 activity in malignant melanoma cell line culture CRL 1872. Increasing doses of terfenadine induced higher caspase-9 activity in malignant melanoma cell line culture CRL 1872.

Keywords: Apoptosis, *caspase-9*, melanoma maligna, *terfenadine*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 4, Agustus 2013; Korespondensi: Sjafrida. Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto No. 2 Malang, Tel. (0341) 341945 Email: pinkopthdr@gmail.com

PENDAHULUAN

Melanoma maligna adalah suatu keganasan yang berasal dari melanosit pada dermoepidermal *junction* yang predominan didapatkan pada kulit dan juga dapat ditemukan pada saluran pencernaan dan mata. Melanosit adalah sel yang secara normal terdapat pada kulit yang mempunyai peran dalam memproduksi pigmen melanin. Hampir separuh kasus melanoma maligna berasal dari nevus yang telah ada dan sisanya berasal dari kulit yang nampak normal (1,2). Berdasarkan data WHO, angka mortalitas dari melanoma maligna adalah 48.000 angka kejadian yang tersebar diseluruh dunia. Melanoma palpebra yang merupakan bagian dari melanoma okular, selain melanoma konjungtiva dan melanoma uvea, adalah suatu keganasan yang jarang terjadi pada palpebra dengan angka kejadian kurang dari 1%. Melanoma konjungtiva memiliki angka mortalitas sebesar 25% dengan metastase yang utama pada kelenjar limfonodus parotid dan submandibula. Selain dapat terjadi metastase pada kelenjar limfonodi regional, melanoma maligna juga dapat mengadakan metastase ke organ paru-paru, hepar, kulit dan otak (1-6).

Manajemen terapi melanoma maligna merupakan suatu tantangan yang cukup berat dalam bidang onkologi. Standar terapi melanoma maligna adalah pemakaian monoterapi *Dacarbazine*, akan tetapi total respon pemakaian *Dacarbazine* hanya 15-20% dengan angka ketahanan hidup hanya 6-7 bulan. Pada masa kini, pencarian agen anti kanker baru pada melanoma maligna yang lebih selektif merupakan prioritas yang utama. Sebagian besar anti kanker yang sekarang telah beredar mempunyai efek sitotoksik melalui jalur apoptosis. Akan tetapi, semua agen anti kanker tersebut mempengaruhi bukan hanya pada sel-sel kanker saja, tetapi juga mempengaruhi sel-sel yang masih normal sehingga agen anti kanker ini tidak memiliki sifat terapi yang spesifik. Oleh karena itu, pada saat ini dicari suatu agen anti kanker yang lebih spesifik sebagai pilihan terapi terhadap melanoma maligna (7-9).

Apoptosis atau *programmed cell death* adalah suatu proses fisiologi yang memiliki peranan penting dalam proses homeostatis jaringan. Proses apoptosis adalah salah satu cara kematian sel yang direncanakan secara teratur oleh suatu *serial signal cascade* yang terjadi pada suatu kondisi tertentu. Apoptosis memiliki peranan penting dalam pengaturan perkembangan, pertumbuhan dan respon imunitas serta "membersihkan" sel-sel yang berlebihan jumlahnya atau sel-sel abnormal pada suatu organisme. Apabila terjadi suatu gangguan pada proses apoptosis ini, maka akan menyebabkan terjadinya insufisiensi pada proses "kematian" sel-sel yang akan menyebabkan terjadinya beberapa penyakit seperti keganasan. Proses apoptosis merupakan salah satu mekanisme yang penting dimana suatu anti kanker dapat membunuh sel-sel kanker (9-12). Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *terfenadine* terhadap aktivitas *caspase-9* pada kultur sel melanoma maligna dan untuk mengetahui hubungan antara perubahan dosis *terfenadine* dengan perubahan aktivitas *caspase-9* pada kultur sel melanoma maligna.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in*

vitro, dengan menggunakan kultur sel melanoma maligna yang dipapar menggunakan *terfenadine*, dengan menggunakan rancangan percobaan *post test only study*. Penelitian dilakukan di Laboratorim Faal divisi Fisiologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Subjek penelitian pada percobaan ini adalah kultur sel melanoma maligna yang akan dipapar dengan berbagai dosis *terfenadine*. Kultur sel melanoma maligna dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan dengan paparan *terfenadine* dosis 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, dan 40 μ M.

Melanoma maligna *cell line* adalah *cells line* yang berasal dari kultur sel melanoma maligna CRL 1872 yang didapat dari *American type culture collection*, ATCC, Rockville, MD. *Terfenadine* merupakan suatu selektif antagonis reseptor H1 histamin dalam *terfenadine* dalam larutan kloroform 50mg/ml dalam kemasan khusus yang digunakan pada kepentingan laboratorium dan didapat dari *The Sigma Chemical Co.* (St Louis, MO). Aktivitas *caspase-9* merupakan aktivitas enzim *caspase-9* yang diamati menggunakan teknik imunositokimia menggunakan anti *caspase-9* yang didapat dari *BD Pharmingen* (San Diego, CA) yang ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel dengan *counter stain* warna biru.

Pengamatan aktivitas *caspase-9* diukur dengan teknik imunositokimia dan imunohistokimia (*imunoperoxidase*). Sediaan awal *terfenadine* 50 mg/ml dalam kloroform adalah 50 mg *terfenadine* dalam 1 ml kloroform (berat molekul *terfenadine* 471,673 dan berat molekul kloroform 119,38). Membuat *stock terfenadine* 200 μ M, lalu dilakukan pengenceran *stock terfenadine* 200 μ M sehingga didapatkan dosis 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 40 μ M. Kultur sel melanoma maligna terbagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kultur sel melanoma maligna yang mendapat perlakuan dibagi menjadi 4 grup yang masing-masing dipapar dengan *terfenadine* dosis 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 40 μ M yang kemudian diinkubasi selama 8 jam.

HASIL

Gambaran kultur *cell line* melanoma maligna CRL 1872 pada hari ke-2, menunjukkan sel-sel melanoma maligna berbentuk sel gelondong poligonal, pipih yang disertai permukaan sel yang mulus ditandai dengan penampakan inti yang utuh, membran plasma, sitoplasma, matrik ekstraselular, *monolayer*, dan tidak didapatkan adanya sel-sel melanoma yang mengalami apoptosis. Aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 ditandai oleh gambaran sel berwarna coklat dengan *counter stain* warna biru (Gambar 1,2).

Gambar 1. Gambaran kultur melanoma maligna (A) dan aktivitas *caspase 9* (B)

Gambar 2. Gambaran aktifitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna

Keterangan: (A). Kelompok control yaitu melanoma maligna *cell line* CRL 1872 tanpa perlakuan, (B). Kelompok melanoma maligna *cell line* CRL 1872 yang dipapar dengan terfenadine 5 µM, (C). Kelompok melanoma maligna *cell line* CRL 1872 yang dipapar dengan terfenadine 10 µM, (D). Kelompok melanoma maligna *cell line* CRL 1872 yang dipapar dengan terfenadine 25 µM, (E). Kelompok melanoma maligna *cell line* CRL 1872 yang dipapar dengan terfenadine 40 µM.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 dalam beberapa dosis *terfenadine* dan kontrol menunjukkan perbedaan dosis *terfenadine* pada setiap kelompok perlakuan memberikan pengaruh atau efek yang berbeda terhadap aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872. Hasil uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan efek *terfenadine* pada setiap perlakuan terhadap aktivitas *caspase-9* pada Kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 ($F=16,003$, $p<0,001$)

Gambar 3. Grafik aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 dalam berbagai dosis *terfenadine*

Pada Gambar 3 dapat dilihat pemberian *terfenadine* 40 µM mempunyai rata-rata aktivitas *caspase-9* yang paling tinggi daripada kelompok yang diberi *terfenadine* dengan dosis lainnya. Kelompok perlakuan *terfenadine* 40 µM (mean=80,6%) lebih efektif dalam meningkatkan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 daripada *terfenadine* 25 µM (mean=71,3%).

Pemberian *terfenadine* dengan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 ($r=0,844$; $p=0,000$) mempunyai hubungan positif yang signifikan dengan arah korelasi yang positif. Artinya adanya peningkatan dosis *terfenadine* hingga dosis 40 µM cenderung akan meningkatkan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872, dibandingkan dengan pada dosis *terfenadine* yang lebih rendah

DISKUSI

Jangi dalam penelitiannya tentang peran *H1 histamine receptor antagonist* dalam menginduksi terjadinya genotoksik dan apoptosis pada sel melanoma human mengemukakan bahwa sediaan *terfenadine* mampu menginduksi terjadinya kematian sel human melanoma melalui jalur *caspase*. Dari semua *H1 histamine receptor antagonis* Jangi menyatakan bahwa terfenadin merupakan sediaan yang menunjukkan potensi terbaik dalam menginduksi jalur *caspase*. Dalam hal ini, *terfenadine* dapat menyebabkan terjadinya hiperpolarisasi pada membran mitokondria diikuti dengan kolapnya membran potensial mitokondria serta terlepasnya sitokrom C ke sitosol dan selanjutnya akan mengaktivasi *caspase-9* (9,12,13).

Dari gambaran kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 pada gambar didapatkan gambaran histopatologi sel-sel melanoma maligna berbentuk sel gelondong poligonal yang memiliki kesesuaian gambaran histopatologi dengan tipe Melanoma sel *Spindell* pada melanoma uvea (14). *Tukey's test* menunjukkan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872 mengalami peningkatan dengan rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan kontrol ketika diberi *terfenadine* pada dosis 5 µM, 10 µM, 25 µM dan 40 µM. Aktivitas *caspase-9* pada kelompok kontrol ($55,4\% \pm 10,3\%$) tidak berbeda signifikan (bermakna) dengan aktivitas *caspase-9* pada kelompok perlakuan yang diberi *terfenadine* 5 µM ($62,4\% \pm 4,9\%$) dengan $p>0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan ini dapat terjadi karena pada dosis *terfenadine* 5 µM meskipun telah mampu menimbulkan peningkatan kadar Ca^{++} dalam sitosol yang berperan penting dalam terjadinya proses apoptosis pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872, akan tetapi pada dosis *terfenadine* 5 µM tersebut belum terjadi peningkatan yang optimal sehingga perbandingan aktivitas *caspase-9* pada 2 kelompok ini tidak berbeda secara signifikan.

Aktivitas *caspase-9* pada kelompok kontrol lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas *caspase-9* pada perlakuan *terfenadine* 10 µM, 25 µM, 40 µM ($p<0,05$). Hal ini disebabkan oleh karena pada pemberian dosis *terfenadine* mulai dosis 10 µM ($67,4\% \pm 1,0\%$) telah terjadi peningkatan kadar Ca^{++} dalam sitosol yang optimal untuk terjadinya proses apoptosis yang ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas *caspase-9*. Peningkatan dosis *terfenadine* juga meningkatkan aktifitas *caspase 9* hingga

dosis maksimal yaitu pemberian dosis *terfenadine* 40 μM akan terjadi efek yang paling maksimal. Pernyataan tersebut diatas sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jangi, yang mengungkapkan bahwa peningkatan kadar Ca^{++} dalam sitosol yang disebabkan oleh paparan *terfenadin* mulai terjadi secara optimal setelah diinkubasi selama 8 jam pada pemakaian dosis *terfenadin* sebesar 10 μM (9). Pada pemakaian dosis 25 μM akan terjadi peningkatan kadar Ca^{++} sitosol 4 kali lipat dari kadar *baseline*, sedangkan efek maksimal terjadi pada pemakaian dosis 40 μM *terfenadine* (24-27). Faktor-faktor lain yang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis dapat berupa stres genotoksik, *growth factor withdrawal* atau

dari adanya perubahan *granzyme B* dari *cytotoxic lymphocytes* yang dapat mengaktivasi jalur instrinsik dari *caspase-9* (26,27).

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pemberian *terfenadine* meningkatkan aktivitas *caspase-9* pada kultur melanoma maligna *cell line* CRL 1872. Hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar penelitian selanjutnya yaitu efek *terfenadine* terhadap aktivitas *caspase-9* pada melanoma maligna secara *in vivo* dan penelitian lanjutan efek *terfenadine* terhadap aktivitas *marker* lain yang terdapat pada jalur instrinsik *caspase-9 dependent pathway* pada kultur sel melanoma maligna.

DAFTAR PUSTAKA

- Wolff K and Goldsmith LA. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th edition. USA: The McGraw-Hill Companies; 2008; p. 1134-1157.
- Andrew S. *Disease of the Skin: Clinical Dermatology*. Canada: Saunders Elsevier; 2006; p. 694-699.
- Rigel DS and Carucci JA. *Malignant Melanoma: Prevention, Early Detection and Treatment in the 21st Century*. A Cancer Journal for Clinicians. 2000; 50(4): 215-236.
- Markovic SN, Erickson LA, Rao R, et al. *Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 2: Staging, Prognosis, and Treatment*. Mayo Clinic Proceedings. 2007; 82(4): 490-513.
- Khurana AK. *Comprehensive Ophthalmology*. 4th edition. New Delhi: New Age International; 2007; p. 162-166.
- Hurst E, Harbour W, and Cornelius LA. *Ocular Melanoma. A Review and the Relationship to Cutaneous Melanoma*. Archives of Dermatology. 2003; 139: 1067-1073.
- Halama N, Zoernig I, and Jaeger D. *Review Article. Advanced Malignant Melanoma: Immunologic and Multimodal Therapeutic Strategies*. Journal of Oncology. 2010; 2010: 8.
- Hsan KM, Chen CC, and Shyur LF. *Current Research and Development of Chemotherapeutic Agents for Melanoma*. Cancers Journal. 2010; 2: 397-419.
- Jangi SM, Di'az-Pe'rez J, Ochoa-Lizarralde B, et al. *H1 Histamine Receptor Antagonists Induce Genotoxic and Caspase-2-dependent Apoptosis in Human Melanoma Cells*. Carcinogenesis. 2006; 27(9): 1787-1796.
- Yin XM and Dong Z. *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. New Jersey: Humana Press; 2003.
- Elkon KB. *Apoptosis and Its Relevance to Autoimmunity*. Current Directions in Autoimmunity. 2006; 9: 1-17.
- Jangi SM, Asumendi A, Arlucea J, et al. *Apoptosis of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Diphenhydramine, an H1 Histamine Receptor Antagonist*. Oncology Research. 2004; 14(7-8): 363-372.
- Haak FM, Darvas Z, Hegyesi Y, et al. *Histidine Decarboxylase Expression in Human Melanoma*. The Journal of Investigative Dermatology. 2000; 115: 345-352.
- Hegyesi H, Somlai B, and Varga VL. *Suppression of Melanoma Cell Proliferation by Histidine Decarboxylase Specific Antisense Oligonucleotides*. The Journal of Investigative Dermatology. 2001; 117: 151-153.
- Graff L, Frungieri M, Zanner R, et al. *Short Communication. Expression of Histidine Decarboxylase and Synthesis of Histamine by Human Small Cell Lung Carcinoma*. American Journal of Pathology. 2002; 160: 1561-1565.
- Pos Z, Safrany G, Muller K, et al. *Phenotypic Profiling of Engineered Mouse Melanomas with Manipulated Histamine Production Identifies Histamine H2 Receptor and Rho-c as Histamine Regulated Melanoma Progression Marker*. Cancer Research. 2005; 65: 4458-4466.
- Rizzuto R, Pinton P, and Ferrari D. *Calcium and Apoptosis: Facts and Hypotheses*. Oncogene. 2003; 22: 8619-8627.
- Henry-Mowatt J, Dive C, and Martinou JC. *Role of Mitochondrial Membrane Permeabilization in Apoptosis and Cancer*. Oncogene. 2004; 23: 2850-2860.
- Cerella C, Diederich M, and Ghibelli L. *Review Article: The Dual Role of Calcium as Messenger and Stressor in Cell Damage, Death, and Survival*. International Journal of Cell Biology. 2009; 2010: 14.
- Wang X. *The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis*. Genes and Development. 2001; 15: 2922-2933.
- Van Loo G, Saelens X, and Van Gurp M. *The Role of Mitochondrial Factors in Apoptosis: A Russian Roulette with More Than One Bullet*. Cell Death and Differentiation. 2002; 9: 1031-1042.
- Limb SL and Wood RA. *Antihistamine*. USA: The McGraw-Hill Companies. 2008; p. 2186-2193.