

Kombinasi Elektroporasi dan Aspirin Menghambat Aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NFkB) pada Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi Pasien Leukemia Akut

Zuly Vita Aulya*, Maimun Z. Arthamin**, Syahrul Chilmi***, Moch. Aris Widodo****, Hidayat Sujuti***

ABSTRAK

Leukemia akut (LA) adalah keganasan klonal akibat mutasi gen somatik pada progenitor sel hematopoietik. Mutasi ini menyebabkan pertumbuhan sel hematopoietik berhenti. Penanganan LA saat ini masih menggunakan protokol kemoterapi standar dengan angka kekambuhan yang tinggi sehingga diperlukan peningkatan dosis yang secara tidak langsung meningkatkan efek samping. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas dan efisiensi kombinasi antara elektroporasi dan aspirin pada kultur sel mononuklear darah tepi pasien LA. Penelitian ini adalah studi eksperimental menggunakan *randomized post test only controlled group design*. Sampel penelitian adalah isolat sel mononuklear darah tepi (PBMC) pasien LA yang diambil dari lab PK RSSA dengan studi *ex vivo* yang dibagi dalam 4 kelompok dengan pemberian paparan listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin dalam tiga variasi dosis (PA1 = 2,5 mmol ; PA2 = 5 mmol ; PA3 = 10 mmol). Ekspresi NFkB diidentifikasi dengan metode imunositokimia. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *analysis of varian* (ANOVA). Adanya perbedaan ekspresi NFkB pada keempat kelompok tersebut diuji dengan *post hoc multiple comparison test*. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok PA3 ekspresi NFkB menurun paling tinggi dibandingkan dengan kelompok PA1 dan PA2. Penelitian ini menyimpulkan bahwa kombinasi elektroporasi dan aspirin dapat meningkatkan jumlah kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut yang mengalami apoptosis setelah diberikan perlakuan dengan melihat penurunan ekspresi NFkB secara signifikan.

Kata kunci: Apoptosis, Aspirin, Leukemia akut (LA), Listrik pulsasi, NFkB.

Combination of Electroporation and Aspirin Inhibit Activation of Nuclear Factor Kappa B (NFkB) in Mononuclear Cell Culture of Patient Acute Leukemia's Peripheral Blood

ABSTRACT

Acute leukemia (AL) is a clonal malignancy caused by a somatic mutation in hematopoietic progenitor cells. This mutation can stop hematopoietic cells growth. Nowadays, the treatment of AL used a standard chemotherapy protocol with a high recurrence rate, hence increased doses are needed and consequently enhance the side effects as well. The research aimed to determine the effectiveness and efficiency of electroporation and aspirin combination in PBMCs of AL patients. Aspirin works by inhibiting NFkB as a transcription factor that regulate proliferation and apoptosis in cells, whereas transient permeabilized by electroporation can be used to incorporate molecules with varying sizes. Electroporation was done by expose the cells to a certain amount of electricity therefore the uptake of aspirin increased in minimal dose and became more effective. This research was an experimental study used post test only randomized controlled group design . The samples were peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of AL patients which taken from laboratory of clinical pathology in RSSA. The *ex vivo* studied was design in 4 groups by administering electric exposure at 200 Hz for 5 seconds and 3 aspirin doses (PA1 = 2,5 mmol; PA2 = 5 mmol; PA3 = 10 mmol). The expression of NFkB was measured by using immunocytochemistry. The amount cells which expressed NFkB expression were analyzed by ANOVA and the differences in the expression of NFkB within groups were then determined by using the post hoc multiple comparison test . The results showed that the PA3 had the lowest expression of NFkB compared to PA1 and PA2. To conclude, the combination of electroporation and aspirin were able to increase PBMCs apoptosis of AL patients by measuring the expression of NFkB.

Keywords: Acute leukemia (AL), Aspirin, Apoptosis, Electrical pulsation, NFkB.

* Program Studi Pendidikan Dokter, FKUB

** Lab Patologi Klinik, RSSA - FKUB

*** Lab Biokimia Biomolekuler, FKUB

**** Lab Farmakologi, FKUB

PENDAHULUAN

Leukemia akut merupakan keganasan klonal pada sumsum tulang yang bisa terjadi pada prekursor seri limfoid (limfoblas) atau myeloid (myeloblas) dengan akibat terhentinya perkembangan (*arrest of development*) sel hematopoietik normal pada sumsum tulang. Pada leukemia akut didapatkan kelainan proliferasi dan apoptosis yang ditandai dengan adanya ekspresi *nuclear factor kappa-B* (NFkB) yang berlebihan di inti sel.¹

Berdasarkan data epidemiologi WHO didapatkan insiden leukemia akut di dunia terjadi sekitar 2,4 kasus pada setiap 100.000 populasi per tahun. Sementara di Indonesia, insiden leukemia akut diprediksi sekitar 3,4 kasus setiap 100.000 populasi per tahun. Leukemia akut menduduki 10 % dari keseluruhan kanker pada manusia dan menyebabkan kematian pada anak-anak dan dewasa dibawah usia 35 tahun.²

Saat ini, hanya sekitar 20-30 % dari pasien LA dewasa saja yang mengalami remisi komplisit dengan regimen kemoterapi standar. Sementara pada anak, sebanyak 30 % mengalami kegagalan terapi. Protokol kemoterapi terdiri atas 4 komponen antara lain fase induksi, konsolidasi, *maintenance*, dan profilaksis sistem saraf pusat. Pada masing-masing fase terapi menggunakan kombinasi agen kemoterapi dan kortikosteroid. Namun, terapi kombinasi yang ada saat ini memiliki banyak efek samping. Selain harga yang mahal dan angka *relaps* yang masih tinggi, pemberian kemoterapi dosis tinggi mengakibatkan keterlibatan sistemik yang menyebabkan sel-sel sehat yang memiliki proliferasi cepat misalnya rambut akan ikut terganggu.³

Sejak tahun 1999 banyak ilmuwan yang bereksperimen dengan menggunakan medan listrik untuk berbagai macam kepentingan medis. Hal ini dikarenakan kemampuan medan listrik dengan besaran tertentu (yang tidak menimbulkan efek kerusakan jaringan maupun nyeri) dalam merubah permeabilitas membran sel baik *reversible* maupun *irreversible* bergantung besar voltase yang diberikan.⁴ Perubahan permeabilitas tersebut disebabkan oleh pembentukan lubang atau pori akibat induksi listrik atau biasa disebut

elektroporasi. Elektroporasi telah digunakan dalam banyak penelitian untuk meningkatkan *uptake* obat-obatan kemoterapi ke dalam sel target (sel kanker).⁵

Selain elektroporasi, aspirin dan obat anti-inflamasi non-steroid (OAINS) yang lain juga diketahui mampu menginduksi apoptosis pada sel leukemia kronik dan beberapa sel kanker lain. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh *Unitat de Bioquímica* menyatakan bahwa aspirin bekerja dengan menghambat enzim inhibitor kappa B kinase yang merupakan enzim pendegradasi ikatan antara inhibitor kappa B pada sitoplasma tempat NFkB dalam bentuk tidak aktif terikat. Karena enzim tersebut dihambat, maka proses degradasi inhibitor kappa B tidak terjadi dan NFkB tetap tidak aktif. Dengan menekan aktivasi NFkB maka aktifitas gen supresor tumor p53 yang mengalami mutasi dan COX-2 yang mengalami aktivasi berlebih juga terhambat dan mengakibatkan terjadinya regulasi proliferasi dan apoptosis dari sel yang mengalami keganasan tersebut.⁶ Kombinasi elektroporasi dengan paparan listrik menggunakan besaran tertentu dalam penelitian ini diharapkan akan meningkatkan *uptake* aspirin ke dalam sel target, sehingga dapat menurunkan dosis terapi aspirin dengan menurunnya barrier absorpsi obat ke intrasel.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif menggunakan eksperimen murni pada sampel darah tepi pasien leukemia akut. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah *post test only randomized controlled group design* dengan subjek dibagi menjadi 4 kelompok (K+, PA1, PA2, dan PA3) secara random. Kelompok K+ adalah sel kultur leukemia akut yang tidak diberikan perlakuan kombinasi listrik pulsasi sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin. Kelompok perlakuan terdiri dari PA1, PA2, dan PA3 yang masing-masing diberi dosis 2,5 mmol, 5 mmol, dan 10 mmol yang disertai pemberian pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik. Prosedur penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

Pengumpulan Sampel PBMC Pasien Leukemia Akut

Sampel sel mononuklear darah tepi atau PBMC diambil dari lab sentral RSSA menggunakan protokol plebotomi dengan spuit steril dan vacutainer 3 ml berisi antikoagulan EDTA.

Isolasi PBMC Pasien Leukemia Akut

Sampel dari vacutainer diambil dengan mikropipet untuk dipindahkan ke tabung sentrifus. Kemudian ditambahkan PBS NaCl dengan perbandingan 1:1 dengan darah dan dikocok. Setelah itu ditambahkan ficoll dengan perbandingan 1:1 dengan darah dan disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Hasil sentrifugasi adalah sel mononuklear yang akan ditanam di media kultur.

Kultur Sel Hasil Sentrifugasi Pasien Leukemia Akut

Sel hasil sentrifugasi dikultur menggunakan media RPMI ditambah PBS dan antibiotik spektrum luas pada sumuran.

Perlakuan, Panen, dan Fiksasi Sel Kultur Leukemia Akut

Kultur sel lalu diperlakukan dengan paparan kombinasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin yang terbagi dalam tiga dosis. Paparan listrik yang digunakan adalah *direct current* dengan menempelkan anoda dan katoda pada cuvet tempat sel kultur diletakkan. Setelah itu sel diinkubasi selama 3 hari dan dipanen untuk dilakukan fiksasi menggunakan formaldehid 4 %.

Pengukuran Tingkat Apoptosis Kultur Sel Leukemia Akut

Pengukuran tingkat apoptosis kultur sel menggunakan antibodi *rabbit polyclonal antibody* NFkB p65 dengan metode imunositokimia sesuai protokol internasional. Hasil pengukuran tingkat apoptosis kultur sel leukemia akut yang diperoleh dari pengukuran ekspresi NFkB dianalisis secara statistik dengan *oneway* (ANOVA). Tingkat signifikansi sebesar ($p < 0,05$) dan taraf kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$).

HASIL

Penelitian ini menggunakan kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut

dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditentukan untuk mengetahui ekspresi NFkB. Dalam penelitian ini, sel monuklear darah tepi pasien leukemia akut yang dilakukan kultur dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol positif dan tiga kelompok perlakuan yang kemudian dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti NFkB p65 dan diamati menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 400x (Gambar 1). Data diperoleh dengan cara menghitung ekspresi NFkB pada inti dibagi keseluruhan jumlah sel dikalikan 100 % per sepuluh lapang pandang. Berdasarkan Gambar 2 didapatkan bahwa pada kelompok K+ yang tidak diberikan perlakuan apapun, jumlah NFkB yang terekspresi pada inti adalah sebesar 49,12 %. Pada kelompok PA1 sebesar 24,62 %, kelompok PA2 sebesar 12,46 %, dan pada kelompok PA3 sebesar 4,96 %. Dari Gambar 2 tersebut dapat dilihat bahwa terdapat penurunan ekspresi NFkB pada kelompok perlakuan yang menunjukkan semakin tingginya apoptosis pada kelompok tersebut setelah diberikan perlakuan.

Hasil analisis data untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan persentase ekspresi NFkB antar kelompok menggunakan ANOVA didapatkan nilai $p = 0,000$. Sementara untuk mengetahui korelasi antara dosis aspirin yang digunakan dengan persentase ekspresi NFkB menggunakan uji korelasi Pearson didapatkan $p = 0,000$ dan $R = -0,948$.

PEMBAHASAN

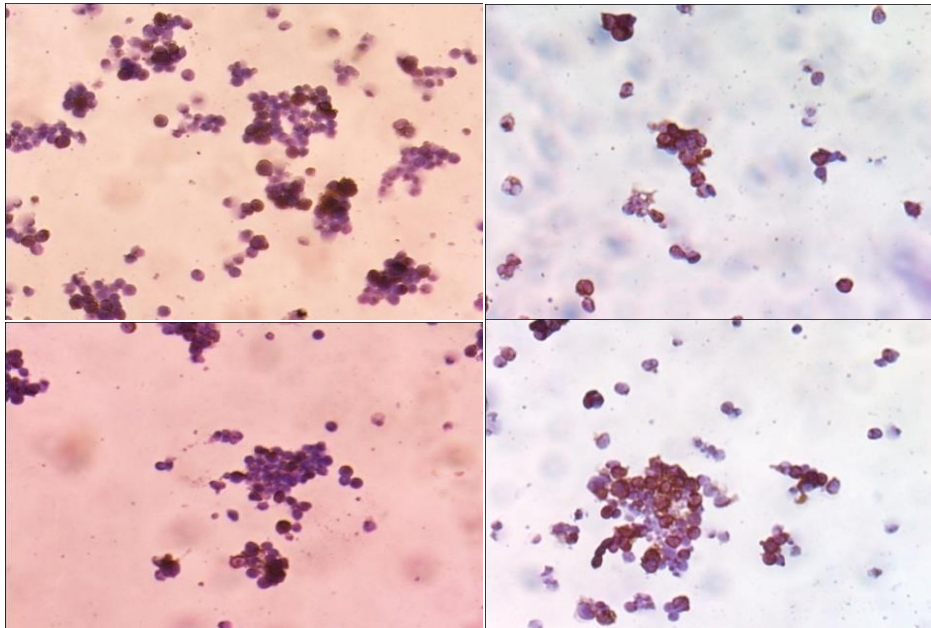
Leukemia akut merupakan keganasan klonal pada sumsum tulang yang ditandai dengan terjadinya perkembangan yang berhenti (*arrest of development*) seri limfoid atau seri myeloid pada tahap awal perkembangannya (sel blas). Hal ini disebabkan oleh ekspresi gen tertentu yang abnormal sebagai akibat dari translokasi kromosom. Akibatnya, terjadi kelainan proliferasi dan apoptosis yang ditandai dengan tingginya ekspresi NFkB dan COX-2.⁶

NFkB merupakan faktor transkripsi yang mengontrol berbagai macam respon biologis. NFkB memerankan fungsi regulasi dari respon imun, inflamasi dan onkogenesis

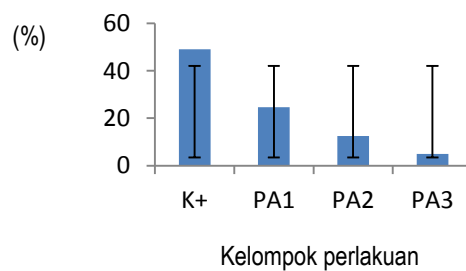
dengan meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam pembentukan dan progresifitas kanker seperti proliferasi, migrasi, dan apoptosis. Pada beberapa kanker, NFκB mengalami mutasi sehingga menyebabkan kegagalan apoptosis pada sel yang mengalami keganasan tersebut.⁷

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh *Unitat de Bioquímica* pada kultur sel kanker colon, menyatakan bahwa aspirin

bekerja dengan menghambat enzim inhibitor kappa B kinase yang merupakan enzim pendegradasi ikatan antara inhibitor kappa B dan NFκB pada. Karena enzim tersebut dihambat, maka proses degradasi inhibitor kappa B tidak terjadi dan NFκB tetap tidak aktif, sehingga tidak bisa melakukan fungsinya dalam proteksi sel yang mengalami keganasan dari apoptosis dan berakhirilah dengan apoptosis sel tersebut.⁸



Gambar 1. Hasil imunohistokimia pada sel kultur mononuklear darah tepi pasien leukemia akut
Keterangan: K = kontrol. PA1 = aspirin 2,5 mmol dan pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik; PA2 = aspirin 5 mmol dan pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik; PA3 = aspirin 10 mmol dan pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik.



Gambar 2. Persentase rata-rata ekspresi NFκB pada tiap-tiap kelompok penelitian

Sebuah penelitian yang menggunakan dosis aspirin 1 sampai 15 mmol/L untuk menginduksi apoptosis dan aktivasi caspase pada *B-CLL lymphocyte* menunjukkan bahwa efek yang dapat diobservasi yaitu pada dosis aspirin 2,5 sampai 15 mmol/L.⁹ Sementara pada penelitian ini menggunakan kombinasi antara aspirin dan elektroporasi menggunakan paparan listrik dan didapatkan rata-rata persentase NFκB sebesar K+ : 49,12 %, PA1: 24,62 % (dosis aspirin 2,5 mmol), PA2: 12,46 % (dosis

aspirin 5 mmol), dan PA3: 4,96 % (dosis aspirin 10 mmol). Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan penambahan perlakuan terhadap kultur sel berupa elektroporasi akibat paparan listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik mengakibatkan terjadinya penurunan ekspresi NFκB pada sel kultur leukemia akut. Ditunjang dengan teori yang menyatakan bahwa dengan menggunakan listrik intensitas rendah (2 V/cm) serta frekuensi sedang (100–300 kHz), menyebabkan perubahan medan listrik yang diinduksi oleh elektroda sehingga

membuka pori membran akibat induksi listrik atau biasa disebut elektroporasi sehingga dapat meningkatkan *uptake* obat-obatan ke dalam sel dan obat dapat bekerja dengan maksimal tanpa melalui membran *barrier* sel. Secara otomatis pada akhirnya diperlukan dosis obat yang lebih sedikit untuk mendapatkan efektifitas yang sama.¹⁰ Pemberian aspirin yang dikombinasikan dengan pulsasi listrik pada kultur sel mononuklear darah tepi penderita leukemia akut akan memicu proses apoptosis dengan memodulasi sinyal NFkB. Pada penelitian ini terbukti didapatkan penurunan ekspresi NFkB yang bermakna antar kelompok. Ekspresi NFkB paling rendah berada pada perlakuan PA3 dengan dosis aspirin 10 mmol/L dan pulsasi listrik 200Hz selama 5 detik ($p = 0,000$).

Pada hasil analisis korelasi Pearson, didapatkan hasil yang cukup kuat ($R = -0,948$) dan signifikan ($p = 0,000$) mengenai hubungan antara peningkatan dosis aspirin yang diberikan dengan persentase ekspresi NFkB pada kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut. Dapat disimpulkan bahwa semakin besar dosis aspirin, maka semakin kecil ekspresi NFkB yang menunjukkan semakin meningkatnya apoptosis pada sel yang mengalami keganasan tersebut. Sementara pada analisis regresi linier didapatkan hubungan negative yang bermakna antara dosis aspirin dan ekspresi NFkB, yaitu ekspresi NFkB dipengaruhi oleh pemberian dosis aspirin 95 %. Apoptosis sel kultur mononuklear yang ditandai dengan penurunan ekspresi NFkB dapat diprediksi dengan rumus:

$$\text{Ekspresi NFkB} = 58,950 - 14,464 \times (\text{dosis aspirin})$$

Namun, tampaknya penurunan jumlah sel ini dapat juga diperankan oleh faktor selain mempengaruhi ekspresi NFkB. Hal tersebut menunjukkan bahwa penghambatan apoptosis sel mononuklear pada leukemia akut tidak hanya diperankan oleh NFkB, tapi juga diperankan oleh beberapa faktor lain yang saling berinteraksi antara lain, peningkatan ekspresi pro-apoptosis Bax dan Bcl-2, penurunan ekspresi anti-apoptosis kaspase 3, dan/atau faktor proliferasi NFkB

Selain dari jalur apoptosisnya sendiri, terdapat pula berbagai faktor yang ikut mempengaruhi apoptosis sel mononuklear leukemia akut tersebut yang dapat disebabkan karena adanya respon individual pasien yang berbeda-beda seperti: *staging* kanker pasien, usia, fenotipe dan genotipe pasien, status gizi, dan sebagainya yang tidak mungkin diseragamkan pada penelitian ini. Penelitian ini menunjukkan peran NFkB sebagai suatu faktor transkripsi yang mampu memodulasi gen apoptosis p53 dalam peningkatan sel mononuklear yang mengalami apoptosis sehingga dapat dipertimbangkan sebagai terapi leukemia akut melalui jalur penghambatan NFkB ini.¹²

Terdapat keterbatasan pada penelitian ini, yaitu: (1) pemeriksaan hanya dilakukan sekali setelah dilakukan paparan kombinasi aspirin dan pulsasi listrik, (2) penentuan sel mononuklear berupa limfosit hanya berdasarkan morfologi (tidak menggunakan petanda/*marker* limfosit sehingga tidak diketahui subset limfosit yang diamati), (3) terdapat keterbatasan sampel sehingga tidak terdapat kelompok perlakuan aspirin atau pulsasi listrik saja, (4) pemberian pulsasi listrik pada penelitian ini masih bersifat asistif, dimana tidak terdapat perubahan frekuensi dan lama paparan, dan (5) faktor-faktor lain yang mempengaruhi apoptosis dan proliferasi sel mononuklear yang tidak diperiksa (6) terdapat respon individual, seperti usia pasien, *staging* kanker pasien, fenotipe dan genotipe pasien, status gizi, serta hal lain yang tidak mungkin diseragamkan pada penelitian ini.

Dengan keterbatasan tersebut perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan: (1) penambahan kriteria inklusi dan eksklusi untuk mendapat sampel yang seragam, (2) pemeriksaan secara serial mulai dari sebelum paparan sampai dengan setelah paparan, (3) pemeriksaan petanda (*marker*) limfosit untuk menentukan subset limfosit (terutama sel T CD4⁺), (4) pemeriksaan dengan teknik *western blot* atau *flowcytometry* untuk mengukur ekspresi Bcl-2 dan marker pro-apoptosis p53, serta (5) pemeriksaan faktor-faktor lain yang mungkin mempengaruhi apoptosis limfosit, antara lain: IFN- γ , Fas/Fas-

L, Bcl-2 Bax, protein pro apoptosis dan anti apoptosis, serta protein proliferasi.

KESIMPULAN

Pembentukan elektroporasi dengan pemberian paparan listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dengan aspirin dosis tertentu dapat meningkatkan apoptosis sel kultur leukemia akut melalui penurunan persentase ekspresi NFkB. Selain itu, pemberian perlakuan pada sel kultur tersebut memiliki korelasi negatif sangat kuat terhadap ekspresi NFkB yang menunjukkan semakin tinggi dosis aspirin maka semakin rendah ekspresi NFkB dan menunjukkan semakin meningkatnya jumlah sel yang mengalami apoptosis.

SARAN

1. Pengamatan sitopatologi dan biomolekuler sel-sel leukemia akut yang telah dikultur sehingga efek peningkatan apoptosis sel yang mengalami keganasan tersebut akan lebih jelas secara sitologi maupun biomolekuler.
2. Penelitian lanjutan dengan menambah jumlah sampel serta kelompok perlakuan sehingga dapat memperoleh hasil yang lebih baik lagi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Evans WE, Relling MV. Chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Nature*. 2008; 429:426-6.
2. Chandrayani W. Epidemiologi, prevalensi dan insiden leukemia akut pada anak. *Jurnal Kesehatan Nasional*. 2009; 3(24). doi:10.1186/1477-7800-3.
3. Conter *et al.* Epidemiology, prevalence, incident, and therapy in acute leukemia. *Hematology Oncology*. 2004; 3(24). doi:10.1186/1477-7800-3-24.
4. Damijan M, Natasa P, Francis XH. *Electric Properties of Biological Tissues*. Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. 2006. p 6.
5. Beebe SJ, *et al.* Nanosecond Pulsed Electric Field (NspEF) Effects on Cells and Tissues: Apoptosis Induction and Tumor Growth Inhibition. *IEEE Trans Plasma Sci*. 2002; 30:286–292.

6. Shimizu D, *et al.* NFkB and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Mediated Anti-Apoptosis May Occur Via Bcl-2 in the Progression of Barrett's Esophagus to Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22(14):9529.
7. Gillmore, K. Nuclear Factor Kappa B as A Transcriptional Factor in Regulation of Apoptotic and Proliferation. 2007.
8. Daniel IS, *et al.* Aspirin Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells Independently of NF-Kappa B and MAPKs Through Alteration of the Mcl-1/Noxa Balance. *Apoptosis*. 2010; 15(2):219-29.
9. Blanchard K. New Anti-Cancer Hybrid Aspirin Developed. 2012. (online). <http://digitaljournal.com/article/320418>. Diakses 22 September 2012.
10. Heller. Electrochemotherapy in Melanoma *Maligna*. Denmark: Herlev Hospital in University of Copenhagen. 1998.
11. Vousden KH, Gehl J *et al.* Internal and External Apoptotic Pathways. Denmark: Herlev Hospital in University of Copenhagen. 2009.
12. Samuel DE, Kathleen MS. Topic of Pediatric Leukemia-Acute Lymphoblastic And Myeloblastic Leukemia. *Medscape General Medicine*. 2009; 7(1):53.

