

Kurkumin Meningkatkan Sensitivitas Sel Kanker Payudara terhadap Tamoksifen Melalui Penghambatan Ekspresi P-glikoprotein dan *Breast Cancer Resistance Protein*

(*Curcumin Increased Breast Cancer Cells Sensitivity to Tamoxifen Through Inhibition of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein Expressions*)

Erlia Anggrainy Sianipar¹, Melva Louisa² dan Septelia Inawati Wanandi³

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta, Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

³Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

Article Info:

Received : 12 Februari 2018

in revised form: 21 Maret 2018

Accepted: 30 Maret 2018

Available Online: 30 Maret 2018

Keywords:

Tamoxifen

Curcumin

P-gp

BCRP

Corresponding Author:

Erlia Anggrainy Sinaipar

Program Studi Farmasi, FK,

Universitas Katolik Indonesia Atma

Jaya Jakarta, 14440, Indonesia

Mobile : 081210445684

Email:

erlia.anggrainy@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

The decreasing of sensitivity or resistance to tamoxifen occurred after long-term treatment in breast cancer. One of the major factor in tamoxifen resistance is over expression of efflux transporter P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Curcumin has known as inhibitor of P-gp and BCRP. The addition of curcumin to the tamoxifen resistant cells is expected to increase the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen. This study aim to know the effect of curcumin in increasing the cell sensitivity to tamoxifen through inhibition of P-gp and BCRP transporter efflux. MCF-7 breast cancer cell line was induced with tamoxifen 1 μ M for 10 passage (MCF-7(T)), then cell viability and mRNA expression of P-gp and BCRP were analyzed. To the MCF-7(T) cells, curcumin was given at of 5/10/20 μ M with or without tamoxifen for 5 days and cell viability and mRNA expression of P-gp and BCRP were analyzed on day 5th. As positive control, verapamil 50 μ M was used as P-gp inhibitor, ritonavir 15 μ M and nelfinavir 15 μ M were used as BCRP inhibitor. The results showed that MCF-7(T) cells sensitivity to tamoxifen decreased with 11.8 times, the cell viability increased 10.82 fold and mRNA expression of P-gp and BCRP increased 4.04 fold. Then after administration of curcumin with or without tamoxifen for 5 days, the cell viability and the mRNA expression of P-gp and BCRP decreased. As conclusion, curcumin increased the sensitivity of MCF-7(T) to tamoxifen characterized by the decreasing of cell viability and mRNA expression of P-gp and BCRP. However, the administration of combination of curcumin with tamoxifen was more potent than just curcumin. The increased sensitivity was estimated at least partly through the inhibition of P-gp and BCRP mRNA expression by curcumin.

Copyright © 2017 JFG-UNTAD

This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Sianipar, E.A., et al. (2018). Kurkumin Meningkatkan Sensitivitas Sel Kanker Payu Dara Terhadap Tamoksifen Melalui Penghambatan ekspresi P-glikoprotein dan Breast Cancer Resistance Protein. *Jurnal Farmasi Galenika : Galenika Journal of Pharmacy*, 4(1), 1-11. doi:10.22487/j24428744.2018.v4.i1.9209

ABSTRAK

Penurunan sensitivitas hingga resistensi terhadap tamoksifen sering terjadi dalam pengobatan kanker payudara jangka panjang. Salah satu penyebab utamanya adalah peningkatan ekspresi transporter efluks P-glikoprotein (P-gp) dan *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP). Kurkumin diketahui sebagai penghambat P-gp dan BCRP. Pemberian kurkumin pada sel yang telah menurun sensitivitasnya terhadap tamoksifen mampu meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap tamoksifen melalui penghambatan kedua transporter tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek kurkumin dalam meningkatkan sensitivitas sel terhadap tamoksifen dengan cara menghambat kerja transporter efluks P-gp dan BCRP. Sel MCF-7 dipaparkan dengan tamoksifen 1 μM selama 10 pasasi (sel MCF-7(T)), kemudian dianalisis perubahan sensitivitas sel terhadap tamoksifen melalui viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP. Pada sel MCF-7(T), kurkumin diberikan dalam dosis 5;10;20 μM dengan atau tanpa tamoksifen selama 5 hari dan dianalisis viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP pada hari ke-5. Sebagai kontrol positif, verapamil 50 μM digunakan sebagai penghambat P-gp, ritonavir 15 μM dan nelfinavir 15 μM sebagai penghambat BCRP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel MCF-7(T) telah menurun sensitivitasnya terhadap tamoksifen yang dibuktikan dengan terjadinya pergeseran CC_{50} sebesar 11.8 kali, peningkatan viabilitas sel sebesar 10.82 kali, dan peningkatan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP sebesar 4.04 kali. Kemudian setelah pemberian kurkumin dengan atau tanpa tamoksifen selama 5 hari, viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP menjadi menurun. Kesimpulan penelitian ini adalah kurkumin meningkatkan sensitivitas sel MCF-7(T) terhadap tamoksifen yang ditandai dengan penurunan viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP. Namun demikian, pemberian kombinasi kurkumin dengan tamoksifen lebih kuat dibandingkan kurkumin saja. Peningkatan sensitivitas tersebut diduga terjadi melalui penghambatan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP oleh kurkumin.

Kata Kunci : Tamoksifen, Kurkumin, P-glikoprotein, BCRP

PENDAHULUAN

Diperkirakan lebih dari satu juta orang di seluruh dunia menderita kanker payudara dan lebih dari 400.000 kematian terjadi setiap tahunnya (Zhou *et al*, 2012). Pengobatan dengan antiestrogen tamoksifen merupakan terapi lini pertama untuk sebagian besar pasien kanker payudara (Lykkesfeldt *et al*, 1994). Namun dalam tiga dasawarsa terakhir, ribuan wanita yang mendapat pengobatan tamoksifen mengalami penurunan respon atau bahkan tidak memberikan respon terhadap pengobatan kemoterapi kanker payudara. Hal ini mungkin terjadi karena timbulnya resistensi (University of California, 2011). Sekitar 40% pasien akhirnya kambuh dan meninggal karena resistensi setelah terapi selama 7-10 bulan (Ring *et al*, 2004 & Wind *et al*, 2011).

Beberapa studi telah menunjukkan bahwa resistensi tamoksifen berkaitan dengan multi-drug resistance (MDR). MDR adalah suatu fenomena resistensi terhadap sejumlah bahan kemoterapeutik yang strukturnya berbeda setelah pemaparan suatu obat anti kanker (Choi *et al*, 2007). Peningkatan ekspresi transporter efluks P-gp dan BCRP diduga menjadi penyebab utama

terjadinya MDR pada kanker payudara (Zhou *et al*, 2012).

Telah dilaporkan bahwa sekitar 30% dari MDR disebabkan oleh over ekspresi P-gp dan kejadian pada kanker payudara lebih dari 50% (Zhou *et al*, 2012 & Bansal *et al*, 2009). Selain itu, pemaparan obat kemoterapi atau terapi hormonal setelah kurang lebih 7-10 bulan telah menunjukkan peningkatan ekspresi P-gp pada kanker payudara sebesar 1.8 kali lipat. 1.5 BCRP bekerja sebagai pompa efluks di sel tumor, timbulnya BCRP yang terekspresi berlebihan mengakibatkan peningkatan konsentrasi obat di dalam sel dan menurunkan efek sitotoksik. Secara klinis telah dilaporkan korelasi positif antara ekspresi BCRP berlebihan dan penurunan efek antikanker terhadap pasien di hematologi dan tumor padat (Mao *et al*, 2005. Ee *et al*, 2004).

Penghambat P-gp atau BCRP biasanya diberikan untuk meningkatkan akumulasi dan efikasi obat antikanker dalam kemoterapi (Anuchapreeda *et al*, 2002). Salah satu senyawa sintetik yang telah diidentifikasi sebagai penghambat P-gp adalah verapamil sedangkan yang merupakan penghambat BCRP yaitu ritonavir dan nelfinavir.

Namun, pada studi hewan coba dan uji klinik efikasi dari senyawa-senyawa tersebut berkurang karena bersifat toksik (Mao *et al*, 2005 & Anuchapreeda *et al*, 2002)

Kurkumin merupakan salah satu penghambat P-gp dan BCRP yang poten (Shukla *et al*, 2009). Kurkumin memiliki aktivitas biologis dan farmakologi yang sangat luas seperti antioksidan, antiinflamasi dan antikanker. Hal ini penting untuk mengatasi peningkatan ekspresi transporter efluks dan meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap antikanker dalam kemoterapi (Anuchapreeda *et al*, 2002).

Kurkumin adalah suatu senyawa polifenol, berupa pigmen berwarna kuning yang terdapat dalam rhizome *Curcuma longa*. Kandungan polifenol ini mengindikasikan bahwa kurkumin dapat mencegah dan mengobati kanker. Kurkumin bekerja dengan menurunkan ekspresi P-gp dan menurunkan efluks yang dimediasi oleh P-gp pada sel kanker yang resisten terhadap suatu obat. Kurkumin juga secara langsung berinteraksi dengan P-gp (Anuchapreeda *et al*, 2002, Aggarwal *et al*, 2003)

Wind (2011) dalam studinya menjelaskan bahwa kurkumin mampu menghambat overekspresi BCRP yang diinduksi oleh mitoxantrone dan pheophorbide A pada sel kanker payudara (MCF-7). Selain itu, Shukla (2009) juga telah meneliti tentang penghambatan transporter efluks BCRP oleh kurkumin pada mencit yang diinduksi sulfasalazin dan menyimpulkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan absorpsi dan distribusi obat yang dipengaruhi oleh BCRP.

Sugiarti (2012) telah melakukan penelitian mengenai pencegahan penurunan sensitivitas sel kanker payudara (MCF-7) terhadap tamoksifen oleh kurkumin. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan sensitivitas sel dengan pemberian tamoksifen 1 μ M selama 12 hari yang ditandai dengan peningkatan ekspresi mRNA P-gp dan viabilitas sel. Namun dengan pemberian kurkumin sejak awal, ekspresi P-gp dan viabilitas sel tersebut menurun.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini kurkumin diharapkan dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara (MCF-7) terhadap pemberian

antikanker tamoksifen jangka panjang selama kurang lebih 10 pasasi. Di samping itu, ingin diketahui apakah peningkatan sensitivitas sel tersebut diperantarai oleh penghambatan transporter efluks P-gp dan BCRP oleh kurkumin.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Biosafety Cabinet Class II (Biohazard), inkubator CO₂ (Esco Memmert), mikroskop inverted (Zeiss), Haemocytometer Improved Neubauer Chamber, Thermo Scientific Centrifuge Eppendorf Sorval® Legend Micro 17, Centrifuge Sorval® Legend RT, Biorad Chromo 4 Real Time PCR Detection System, Ultrospec 4300 pro UV/Visible Spectrophotometer, Microplate reader Benchmark Biorad.

Galur sel kanker payudara MCF-7 (Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FKUI). Tamoksifen (Santa Cruz (USA)). Kurkumin, verapamil, ritonavir dan dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma- Aldrich Ltd (Singapura)). Nelfinavir (PT Kimia Farma). Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) dan Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin/Streptomisin, Gentamisin, Fungizone, Dubelco Phosphate Buffer Solution (D-PBS), dan Tryple Express (Gibco Ltd (Singapura)).

Reagen isolasi total RNA Mini Kit Tripure Isolation Reagent diperoleh dari Roche Diagnostics (Singapura). Primer P-gp, BCRP, dan β -mikroglobulin diperoleh dari 1st BASE Ltd (Singapura). KAPA SBYR Fast one-step qRT-PCR kit Universal diperoleh dari KAPA Biosystem (USA).

Metode

Kultur sel MCF-7

Sel MCF-7 dikultur dengan menggunakan medium DMEM yang disuplementasi dengan 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 1% penisilin dan streptomisin, 0,5% gentamisin dan 1% fungizon kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 5% O₂.

Pemaparan tamoksifen 1 μ M pada sel MCF-7

Sel MCF-7 diberi perlakuan dengan memaparkan tamoksifen 1 μ M secara terus menerus selama 10 pasasi, sel ini selanjutnya dinamakan sel MCF-7(T).

Perlakuan sel MCF-7(T) dengan kurkumin

Sel MCF-7(T) dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan antara lain pemberian tamoksifen 1 μ M saja, pemberian kombinasi tamoksifen 1 μ M dengan kurkumin 5;10;20 μ M, kombinasi tamoksifen 1 μ M dengan verapamil 50 μ M/ritonavir 15 μ M/nelfinavir 15 μ M, pemberian kurkumin 5;10;20 μ M saja, dan pemberian verapamil 50 μ M, ritonavir 15 μ M, nelfinavir 15 μ M saja selama 5 hari. Analisis viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pada hari ke-5. Masing-masing perlakuan dilakukan dalam dua kali percobaan rangkap dua.

Hitung sel menggunakan Trypan Blue Exclusion Method

Sel yang telah konfluen 80-90%, dipanen dengan cara ditripsinisasi dengan menggunakan Tryple Express selama 5 menit, kemudian ditambahkan medium DMEM. Suspensi sel diambil sebanyak 20 μ L dan ditambahkan 10 μ L trypan blue. Sel dihitung dengan menggunakan kamar hitung Neubauer. Sel yang dihitung adalah sel yang hidup yaitu sel yang tidak diwarnai oleh trypan blue.

Isolasi RNA

Sel yang telah konfluen dipanen dan RNA total diekstraksi menggunakan Tripure Isolation Reagent sesuai prosedur yang telah diberikan oleh produsen. Kadar RNA total dikuantifikasi menggunakan Spektrofotometer Ultrospec 4300 pro UV/Visible dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 260 nm dikalikan dengan konstanta 40 ng/ μ L.

Analisis ekspresi mRNA P-gp dan BCRP menggunakan qRT PCR

Sekuens primer yang digunakan pada qRT PCR yaitu β 2-microglobulin (F:5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3'; R:3'-CATGTCTCGATCCCACTTAAC-5'), P-gp (F:5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'; R:3'-TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-5'), BCRP F:5'AGATGGGTTTCCAAGCGTTTCAT-3'; R:3'-CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA-5') (Albermann *et al*, 2005).

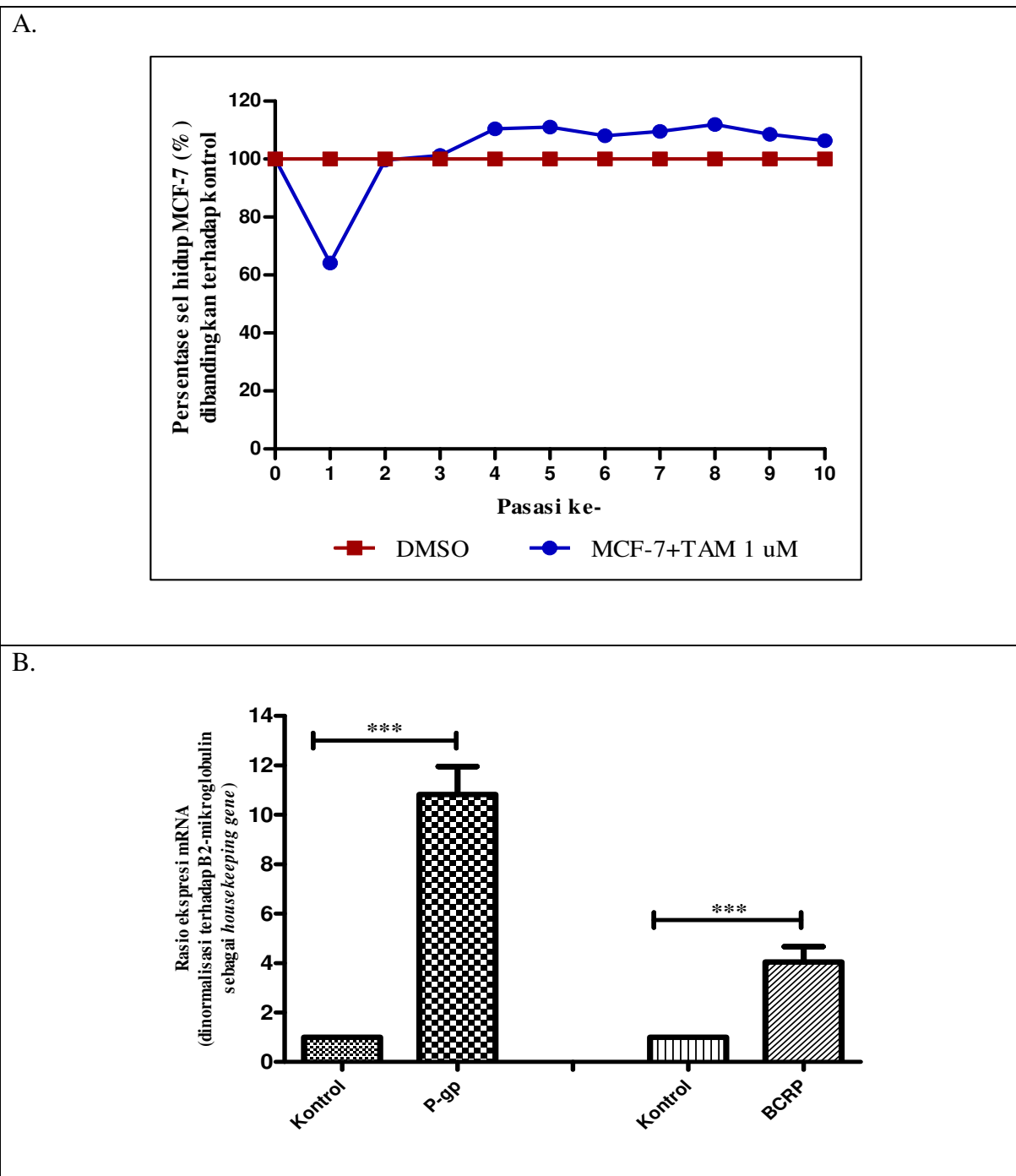
Sampel dipersiapkan dengan mencampurkan 200 nM masing-masing primer, 5 μ L KAPA SYBR® Fast qPCR Master Mix, 0,2 μ L KAPA RT Mix (50x), 0,2 μ L dUTP, 500 ng RNA template, dan RNase free water hingga 10 μ L. Sampel kemudian diinkubasi pada mesin qRT-PCR dengan kondisi sebagai berikut: untuk sintesis cDNA dilakukan pada suhu 42°C selama 5 menit, kemudian 5 menit pada suhu 95°C untuk inaktivasi enzim reverse transcriptase, dan 40 siklus yang terdiri dari 3 detik pada suhu 95°C untuk tahap denaturasi, 20 detik pada suhu 60°C untuk tahap annealing dan 20 detik pada suhu 72°C untuk tahap ekstensi. Setelah itu, dilanjutkan untuk tahap melting curve yaitu dimulai pada suhu 60°C sampai dengan 95°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

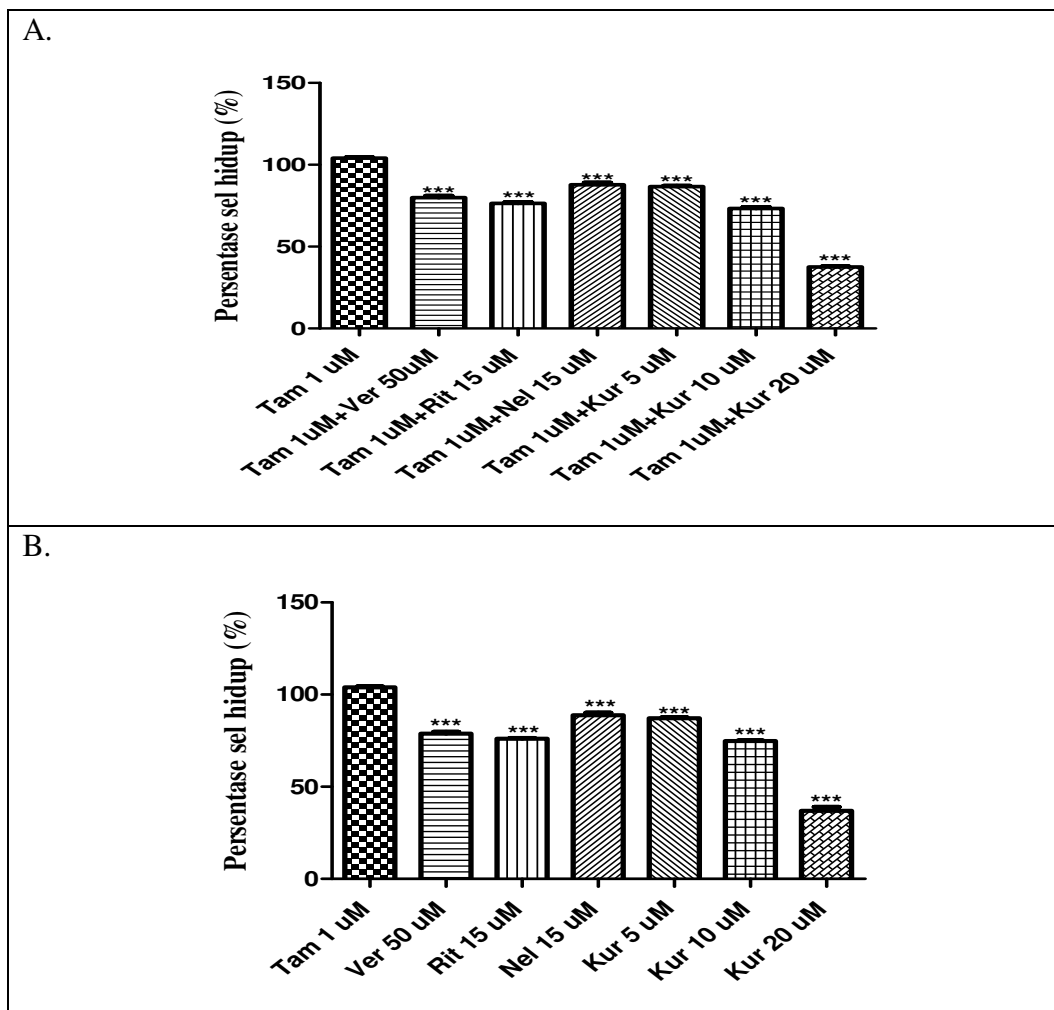
Pada pengamatan viabilitas sel MCF-7(T) menunjukkan bahwa tamoksifen masih dapat menekan pertumbuhan sel pada pasasi ke-1, namun mulai dari pasasi ke-2 efek tamoksifen menurun sehingga tidak dapat membunuh sel kanker (Gambar 1A). Terjadi peningkatan ekspresi mRNA transporter efluks P-gp dan BCRP pada sel MCF-7(T) yaitu berturut-turut sebesar 10.82 kali dan 4.04 kali dibandingkan terhadap kontrol (Gambar 1B).

Analisis viabilitas sel MCF-7(T)

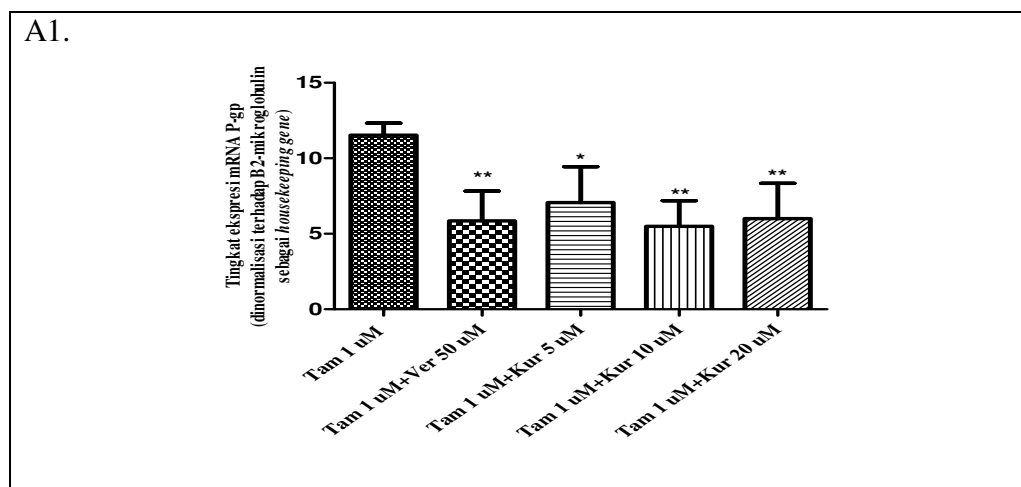
Berdasarkan hasil yang diperoleh dari analisis viabilitas sel terlihat bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara sel MCF-7(T) baik yang dipaparkan kombinasi kurkumin dan tamoksifen maupun kurkumin saja. Kurkumin mampu menurunkan viabilitas sel pada hari ke-5 secara

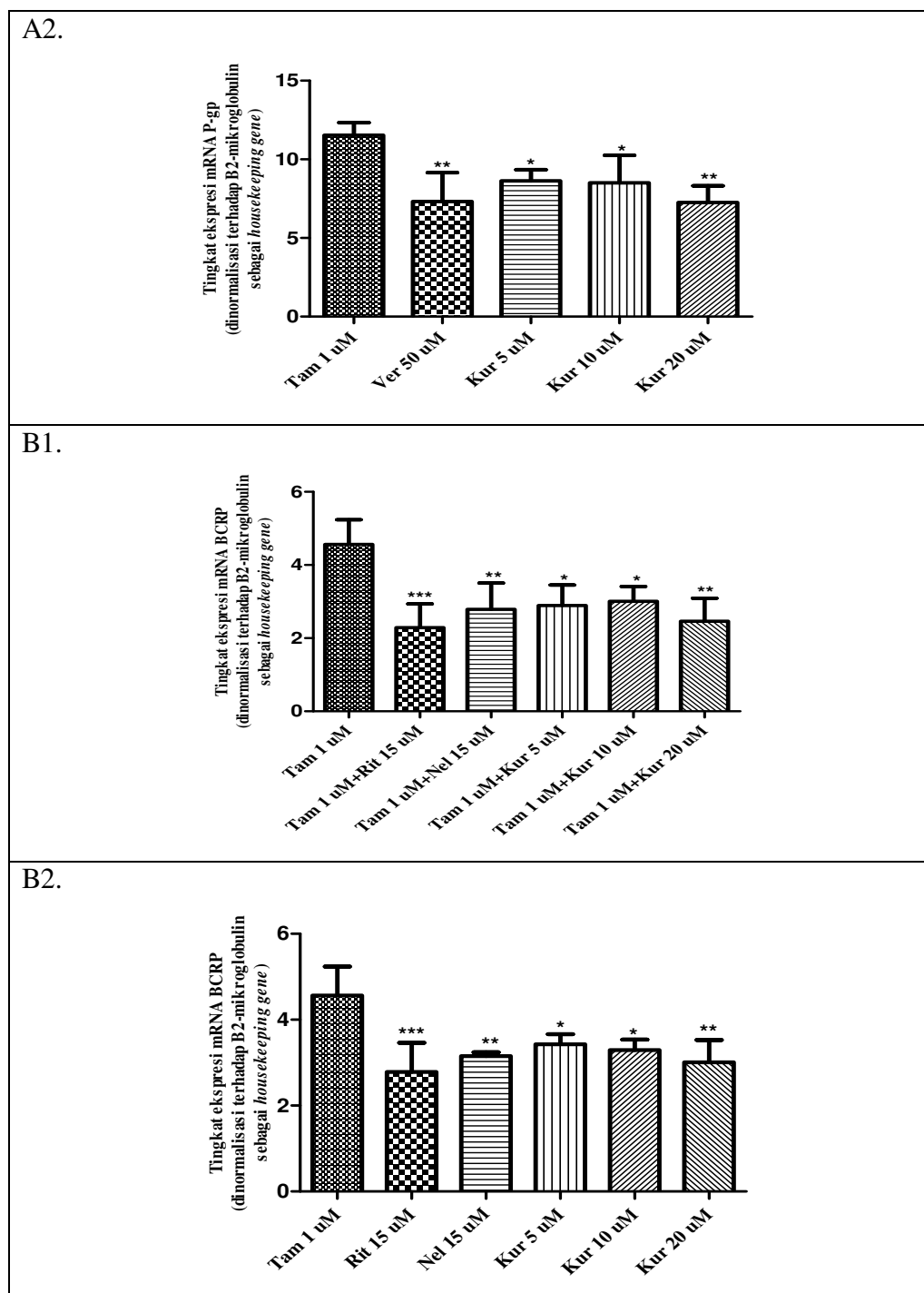


Gambar 1. (A). Persentase sel hidup MCF-7 yang dipaparkan dengan tamoksifen 1 μ M pada pasasi ke-1 hingga pasasi ke-10. Kontrol adalah sel MCF-7 yang dipaparkan DMSO. (B). Perubahan tingkat ekspresi mRNA P-gp dan BCRP pada sel MCF-7(T). Kontrol adalah sel MCF-7 yang tidak diinduksi tamoksifen 1 μ M. Tanda (***) menyatakan bermakna pada $p < 0,001$ setelah uji ANOVA dilanjutkan dengan multiple comparison metode Tukey. Hasil disajikan dalam rerata $\pm$ SD yang diperoleh dari dua kali percobaan terpisah rangkap dua.



Gambar 2. Persentase sel hidup MCF-7(T) setelah paparan kurkumin selama 5 hari dengan atau tanpa pemberian tamoksifen. (A). Viabilitas sel MCF-7(T) setelah paparan tamoksifen 1 μ M + kurkumin 5/10/20 μ M. (B). Viabilitas sel MCF-7(T) pada paparan kurkumin 5;10;20 μ M. Tiap percobaan merupakan hasil dari dua percobaan rangkap dua. Hasil disajikan dalam rerata $\pm$ SD. Tanda (***) menyatakan bermakna pada $p < 0,001$ setelah uji ANOVA dilanjutkan dengan multiple comparison metode Tukey dibandingkan terhadap tamoksifen 1 μ M.





Gambar 3. Ekspresi mRNA P-glikoprotein dan BCRP setelah pemaparan kurkumin selama 5 hari dengan atau tanpa pemberian tamoksifen pada sel MCF-7(T). (A1). Ekspresi mRNA P-gp pada sel MCF-7(T) yang dipaparkan dengan tamoksifen 1 μ M + kurkumin 5;10;20 μ M. (A2). Ekspresi mRNA P-gp pada sel MCF-7(T) yang dipaparkan dengan kurkumin 5;10;20 μ M. (B1). Ekspresi mRNA BCRP pada sel MCF-7(T) yang dipaparkan dengan tamoksifen 1 μ M + kurkumin 5;10;20 μ M. (B2). Ekspresi mRNA BCRP pada sel MCF-7(T) yang dipaparkan dengan kurkumin 5;10;20 μ M. Tiap percobaan merupakan hasil dari dua percobaan rangkap dua. Hasil disajikan dalam rerata $\pm$ SD. Tanda (*) menyatakan bermakna pada $p < 0,05$; (**)/***) bermakna pada $p < 0,001$ setelah uji ANOVA dilanjutkan dengan *multiple comparison* metode Tukey dibandingkan terhadap tamoksifen 1 μ M. .

proporsional sesuai kadar, bermakna secara statistik. Penurunan viabilitas sel tertinggi dicapai pada kurkumin dengan dosis 20 μM yaitu sekitar 67%, lebih besar dibandingkan kontrol positif verapamil, nelfinavir, dan ritonavir yang hanya mampu menurunkan viabilitas sel berturut-turut sebesar 25%, 16%, dan 28% (Gambar 2).

Analisis ekspresi mRNA P-gp dan BCRP pada sel MCF-7(T)

Ekskresi mRNA P-gp dan BCRP pada sel MCF-7(T) yang diberi perlakuan dengan kurkumin dengan atau tanpa tamoksifen selama 5 hari dapat dilihat pada Gambar 3. Kontrol merupakan sel MCF-7(T) yang diberi diberi tamoksifen 1 μM .

Pada analisis ekspresi mRNA P-gp, pemberian kurkumin berbagai kadar termasuk kontrol positif verapamil 50 μM baik dikombinasi dengan atau tanpa tamoksifen, dapat menurunkan ekspresi P-gp. Pada hari ke-5, paparan kombinasi kurkumin dengan tamoksifen pada kadar yang lebih besar yaitu 10 μM dan 20 μM menurunkan ekspresi mRNA P-gp secara bermakna yaitu menjadi 5,5 kali dan 6 kali. Sedangkan pada kelompok yang dipaparkan kurkumin saja, hanya kurkumin 20 μM yang dapat menurunkan ekspresi mRNA P-gp secara bermakna yaitu menjadi 7,25 kali. Kontrol positif verapamil 50 μM juga menurunkan ekspresi mRNA P-gp secara bermakna pada hari ke-5 (Gambar 3A1 dan 3A2).

Pada analisis ekspresi mRNA BCRP, pemberian kurkumin 5, 10, dan 20 μM dan kontrol positif ritonavir 15 μM dan nelfinavir 15 μM , baik dikombinasi dengan atau tanpa tamoksifen, sama-sama mempengaruhi ekspresi mRNA BCRP pada hari ke-5. Kombinasi kurkumin dengan tamoksifen dapat menurunkan ekspresi mRNA BCRP menjadi 2,46 kali pada dosis 20 μM sedangkan dengan paparan dengan kurkumin saja ekspresi mRNA BCRP menurun menjadi 3,01 kali. Kontrol positif ritonavir 15 μM dan nelfinavir 15 μM juga menurunkan

ekspresi mRNA BCRP secara bermakna pada hari ke-5 (Gambar 3B1 dan 3B2).

Meningkatnya viabilitas mulai dari pasasi ke-2 pada pemaparan tamoksifen 1 μM selama 10 pasasi (± 44 hari) pada galur sel kanker payudara MCF-7 menunjukkan bahwa sel MCF-7 telah menurun sensitivitasnya terhadap pemberian tamoksifen. Penurunan sensitivitas ini terlihat mulai pasasi ke-2 (hari ke-6) dan menetap hingga pasasi ke-10. Namun, model penelitian ini belum dapat memastikan apakah peningkatan viabilitas sel tersebut sudah stabil dan dapat dikatakan resisten karena waktu pemaparan tamoksifen yang relatif singkat. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Kurniawan *et al* (2012) dan Sugiarti *et al* (2012) dimana pemberian tamoksifen 1 μM sudah tidak dapat menekan pertumbuhan sel MCF-7 mulai pada hari ke-6. Penggunaan tamoksifen kadar 1 μM juga sejalan dengan penelitian Motahariet *al*, 2005 pada sel kanker T47D dan Lykkesfeldt *et al*, 1994 pada sel MCF-7 yang telah resisten terhadap tamoksifen. Keduanya menyatakan bahwa kadar tamoksifen 1 μM merupakan kadar dimana viabilitas sel masih cukup baik yaitu $\pm 65\%$ pada T47D dan $\pm 50\%$ pada sel MCF-7. Penelitian oleh Motahari *et al* (2005), mengungkapkan untuk dapat menghasilkan sel MCF-7 resisten yang stabil maka sel MCF-7 harus dipaparkan dengan tamoksifen minimal selama 3 bulan. Louie *et al*, 2010 dalam penelitiannya juga mengembangkan sel MCF-7 yang resisten terhadap tamoksifen (MCF-7 TamR) dengan memaparkan tamoksifen pada konsentrasi 10 μM selama kurang lebih 6 bulan. Resistensi sel MCF-7TamR ini ditandai dengan cepatnya laju pertumbuhan sel dibandingkan dengan sel MCF-7 apabila dipaparkan tamoksifen, sedangkan pada kondisi normal tanpa paparan tamoksifen laju pertumbuhan sel MCF-7TamR dan MCF-7 sama.

Peningkatan ekspresi mRNA P-gp sebesar 10,82 kali pada sel MCF-7(T) juga sejalan dengan penelitian Kurniawan *et al*, 2012 dan Sugiarti *et al*, 2012 dimana ekspresi mRNA P-gp pada sel MCF-7 yang diinduksi tamoksifen

meningkat pada hari ke-6 sebesar 1,10 kali. Selain itu penelitian oleh Sane et al juga menyatakan bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA P-gp pada sel hepatosit manusia HepG2 dan sel kanker kolon LS174T yang masing-masing dipaparkan tamoksifen pada kadar 1 μ M, 2.5 μ M, dan 5 μ M selama 72 jam adalah berturut-turut sebesar 1.17 kali, 1.37 kali, dan 1.60 kali pada sel HepG2 dan 1.46 kali, 1.9 kali, dan 2.98 kali pada sel LS174T.

Penelitian ini menemukan bahwa ekspresi mRNA BCRP pada sel MCF-7(T) meningkat sebesar 4.04 kali. Farabegoli et al, 2010 dalam penelitiannya, membuktikan bahwa pada sel MCF-7 yang resisten terhadap tamoksifen terdapat peningkatan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP, kemudian setelah diberi perlakuan dengan *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) pada dosis 100 ug/ml selama 48 jam maka ekspresi mRNA P-gp dan BCRP tersebut menurun sebesar 53% dan 20%. Jika dibandingkan dengan hasil yang didapat dalam penelitian ini, ditemukan bahwa lamanya paparan/induksi dengan tamoksifen sangat mempengaruhi peningkatan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP. Semakin lama waktu induksi dengan tamoksifen, maka akan memberikan peningkatan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP yang lebih tinggi.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari analisis viabilitas sel, efek pemberian kurkumin dengan maupun tanpa tamoksifen pada sel MCF-7(T) selama 5 hari membuktikan bahwa kurkumin mampu menekan viabilitas sel. Menurut Shehzad et al, 2010 kurkumin dapat menekan pertumbuhan sel kanker melalui berbagai cara seperti menghambat faktor transkripsi (NF-kB dan AP-1), menghambat enzim (COX-2 dan MMPs), menghambat sitokin dan STAT, menghambat cyclin D1, menginduksi apoptosis, dan lain sebagainya.

Pada analisis tingkat ekspresi mRNA P-gp dan BCRP, pemberian kombinasi kurkumin dengan tamoksifen lebih kuat menurunkan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP dibandingkan terhadap pemberian kurkumin saja. Hasil ini menunjukkan bahwa kemungkinan pemberian

kombinasi kurkumin dengan tamoksifen menghasilkan efek sinergis sehingga lebih kuat menekan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP dibandingkan terhadap pemberian kurkumin saja. Jiang et al, 2013 dalam penelitiannya mengenai kurkumin meningkatkan sensitivitas tamoksifen pada sel kanker payudara MCF-7/LCC2 dan MCF-7/LCC9 mengemukakan bahwa pemberian kombinasi kurkumin dengan tamoksifen dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap tamoksifen sebesar 2.4 kali dibandingkan dengan pemberian tamoksifen saja.

Penurunan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP oleh kurkumin dalam penelitian ini, tidak sebanding dengan penurunan viabilitas sel MCF-7 (T), baik pada pemberian kombinasi maupun dengan kurkumin saja. Berdasarkan hasil tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian kurkumin dapat meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 (T) terhadap tamoksifen, namun bukan hanya melalui penghambatan transporter efluks P-gp dan BCRP. Hal ini kemungkinan disebabkan karena dosis kurkumin yang digunakan kurang tinggi atau waktu paparan yang kurang lama sehingga efek kurkumin dalam menurunkan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP belum terlihat maksimal. Selain itu, diduga bahwa terdapat mekanisme transporter lain yang mempengaruhi kerja kurkumin dalam menghambat P-gp dan BCRP tersebut. Chearwae et al, 2005 dalam studinya menemukan bahwa kurkumin dapat menurunkan ekspresi transporter efluks MRP-1 pada galur sel embrionik ginjal manusia HEK293 sehingga meningkatkan sensitivitasnya terhadap etoposide. Krisnamurti et al, 2013 dalam penelitiannya juga menunjukkan bahwa kurkumin mampu menurunkan ekspresi mRNA MRP-2 secara bermakna setelah pemaparan selama 5 hari.

Mekanisme kurkumin dapat menurunkan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP tidak dipelajari dalam penelitian ini. Kemungkinan mekanisme yang terlibat antara lain seperti dalam studi Anuchapreeda et al (2002) yang menguji efek kurkumin terhadap aktivitas ATPase dan

pengikatan terhadap P-gp melalui fotoafinitas analog dari substrat, mengindikasikan bahwa kurkumin menghambat P-gp pada tahap imunoreaktif protein dan menurunkan ekspresi pada tahap mRNA. Selain itu, studi oleh Aggarwal *et al*, 2006 melaporkan bahwa kurkumin merupakan inhibitor yang sangat kuat terhadap faktor transkripsi AP-1, yang berkorelasi positif dalam mengatur ekspresi P-gp. Pada penelitian Waiwut *et al*, 2002 dikatakan bahwa mekanisme kurkumin menghambat P-gp kemungkinan karena kurkumin dapat menghambat translokasi NF-kB dan aktivitas dan ekspresi dari c-jun/AP1.

Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang meneliti tentang efek kurkumin dalam menghambat transporter efluks BCRP pada sel MCF-7 yang resisten terhadap tamoksifen. Penelitian sebelumnya oleh Chearwae *et al*, 2006 menyatakan bahwa kurkumin merupakan penghambat fungsi BCRP yang poten, namun bukan bekerja pada tingkat protein tetapi kurkumin menstimulasi hidrolisis ATP dari transporter BCRP.

KESIMPULAN

Pemberian kurkumin dengan atau tanpa tamoksifen dapat mensensitisasi kembali sel kanker payudara MCF-7 terhadap tamoksifen sehingga menurunkan viabilitas sel dan ekspresi mRNA P-gp dan BCRP. Namun temuan ini perlu diklarifikasi lebih lanjut dengan melakukan pengukuran kadar tamoksifen ekstraseluler untuk memastikan kerja penghambatan P-gp dan BCRP oleh kurkumin. Hasil penelitian ini mendukung penggunaan kombinasi tamoksifen dan kurkumin pada sel kanker yang telah resisten.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, BB., Kumar, A., Bharti, AC. (2003). Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, 23, 363-398.
- Aggarwal, BB., Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1397-1413.
- Albermann, N., Winnenthal, FHS., Graggen, KZ., Volk, C., Hoffmann, MM., Haefeli, WE., *et al*. (2005). Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochemical Pharmacology*, 70, 949-958.
- Anuchapreeda, S., Leechanachai, P., Smith, MM., Ambudkar, SV., Limtrakul, P. (2002). Modulation of P-glycoprotein Expression and Function by Curcumin in Multidrug-Resistant Human KB Cells. *Biochemical Pharmacology*, 64, 573-582.
- Bansal, T., Jaggi, M., Khar, RK., Talegaonkar, S. (2009). Emerging Significance of Flavonoids as P-glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 12, 46-78.
- Chearwae, W., Wu, CP., Chu, HY., *et al*. (2005). Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 57, 376-388.
- Chearwae, W., Shukla, S., Limtrakul, P., Ambudkar, SV. (2006). Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1995-2004.
- Choi, HK., Yang, JW., Roh, SH., *et al*. (2007). Induction of Multidrug Resistance Associated Protein 2 in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 293-303.
- Ee, PLR., He, X., Ross, DD., Beck, WT. (2004). Modulation of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Gene Expression Using RNA Interference. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 1577-1583.
- Farabegoli, F., Papi, A., Bartolini, Ostan, R., Orlandi, M. (2010). (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates P-gp and BCRP in a Tamoxifen Resistant MCF-7 Cell Line. *Phytomedicine*, 17, 356-362.
- Jiang, M., Huang, O., Zhang, X., Xie, Z., Shen, A., Liu, H., *et al*. (2013). Curcumin induces cell

- death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. *Molecules*, 18, 701-720.
- Krisnamurti, DGB. (2013). *Peningkatan Sensitivitas Sel Kanker Payudara Terhadap Antikanker Tamoksifen oleh Kurkumin Melalui Penghambatan Transporter Efluks: Studi in vitro pada Sel MCF-7*, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kurniawan, SV. (2012). *Peran piperin sebagai penghambat P-glikoprotein dalam pencegahan resistensi sel kanker payudara terhadap tamoksifen*, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Louie, MC., McClellan, A., Siewit, C. (2010). Estrogen receptor regulates E2F1 expression to mediate tamoxifen resistance. *Molecular Cancer Research*, 8,343-352.
- Lykkesfeldt, AE., Madsen, MW., Briand, P. (1994). Altered Expression of Estrogen Regulated Genes in a Tamoxifen Resistant and ICI 164,384 and ICI 182,780 Sensitive Human Breast Cancer Cell Line, MCF-7/TAM^R-1. *Cancer Research*, 54, 1587-1595.
- Mao, Q., Unadkat, JD. (2005). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 7, E118-129.
- Motahari, Z., Etebary, M., Azizi, E. (2005). Studying the role of P-glycoprotein in resistance to tamoxifen in human breast cancer T47D cells by immunocytochemistry, *International Journal of Pharmacology*, 1, 112-117.
- Ring, A., Dowset, M. (2004). Mechanism of Tamoxifen Resistance. *Endocrine- Related Cancer*, 11, 643-648.
- Shukla, S., Zaher, H., Hartz A, Bauer, B., Ware, JA., Ambudkar, SV. (2009). Curcumin Inhibits the Activity of ABCG2/BCRP1, A Multidrug Resistance-Linked ABC Drug Transporter in Mice. *Pharmaceutical Research*, 26 (2), 480-486.
- Sugiarti, L. (2012). *Penghambatan MDR1 dengan Kurkumin Sebagai Usaha Pencegahan Resistensi Terhadap Antikanker Tamoksifen*, Universitas Indonesia, Jakarta..
- Sane, RS., Buckley, DJ., Buckley, AR., Nallani, SC., Desai, PB. (2008). Role of human pregnane X receptor in tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 36, 946-954.
- Shehzad, A., Wahid, F., Lee, YS. (2010). Curcumin in cancer chemoprevention: Molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm Chemistry In Life Sciences*, 9, 489-499.
- University of California - San Francisco. (2011, November 14). Tamoxifen Resistance and How to Defeat it. *ScienceDaily*, Retrieved from <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/11/1111113141409.htm>
- Waiwut, P., Anuchapreeda, S., Limtrakul, P. (2002). Curcumin inhibit the P-glycoprotein level in carcinoma of cervix cells (KB-carcinoma cell lines) induced by vinblastine. *Chiang Mai Medical Journal*, 41, 139-145.
- Wind, NS., &Holen, I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies. (2011). *International Journal of Breast Cancer*, 2011, 1-10.
- Zhou, G., & Zhang, X. (2012). *Multidrug Resistance and Breast Cancer, Targeting New Pathways and Cell Death in Breast Cancer*. Available from <http://www.intechopen.com/books/targeting-new-pathways-and-cell-death-in-breast-cancer/multidrugresistance-and-breast-cancer>