

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Kanker dan terapi kanker

Kanker merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan angka kematian cukup tinggi di Indonesia maupun di dunia. Penyakit kanker terdiri dari paling sedikit 100 jenis, di Amerika jumlah pasien meninggal mencapai 553.400 dari total penderita 1.268.000 (Greenlee *et al.*, 2001). Penelitian yang sama menunjukkan bahwa kanker menempati peringkat ke dua sebagai penyebab kematian setelah penyakit jantung. Penderita kanker di Indonesia sekitar 4,3% dan menduduki peringkat ke 6 penyebab kematian (Anonim, 1998). Kanker leher rahim dan kanker payudara memiliki tingkat insidensi tinggi pada wanita dari berbagai jenis kanker (Tjindarbumi & Mangunkusumo, 2002).

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti dengan proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh yang lain. Kanker pada dasarnya merupakan sel dengan proliferasi yang tak terkendali akibat kerusakan gen, utamanya pada regulator daur sel (Sher, 1996). Pertumbuhan kanker merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung dalam beberapa bulan atau beberapa tahun (Albert, 1994). Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, dimulai dari satu sel kanker yang memperbanyak diri dan membentuk koloni kecil dalam jaringan yang sama. Selanjutnya terjadi perubahan genetik (seperti aktivasi onkogen) yang menyebabkan koloni dari sel abnormal ini menjadi malignan (Schneider, 1997).

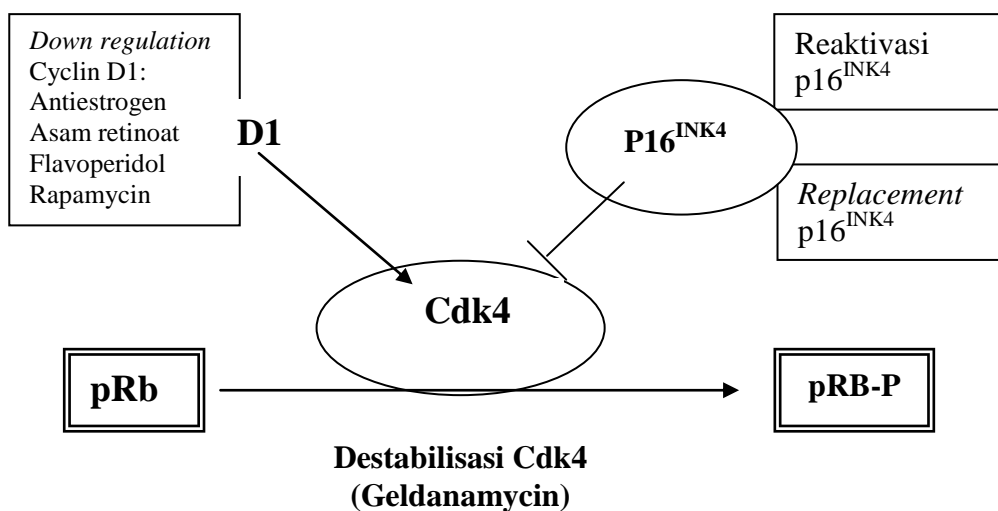
Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan. Secara umum, ciri-ciri dari sel kanker adalah: a) Memiliki kemampuan mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri yang dapat memacu daur sel. b) Insensitivitas terhadap anti faktor pertumbuhan yang menyebabkan daur sel tidak berhenti. c) Kehilangan kemampuan apoptosis (kemampuan melakukan program bunuh diri), sehingga sel tersebut terus bertambah. d) Invasi ke jaringan lain dan masuk ke peredaran darah, sehingga dapat mengalami metastasis. e) Potensi replikasi yang tidak terbatas (*immortal*). f) Kemampuan untuk membentuk saluran darah ke sel kanker (angiogenesis) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Beberapa usaha pengobatan terhadap kanker telah dilakukan secara intensif, yaitu dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi. Diantara ketiga cara tersebut, kemoterapi merupakan pilihan pengobatan yang paling memungkinkan untuk pengobatan kanker pada stadium lanjut (sudah metastasis). Kemoterapi adalah cara pengobatan dengan menggunakan senyawa kimia yang bekerja langsung pada sel kanker. Beberapa agen kemoterapi yang sering digunakan dalam pengobatan kanker payudara adalah Adriamycin (doxorubicin), Aredia (pamidronate disodium), Cytosan (cyclophosphamide), Ellence (epirubicin), Fareston (toremifene), Tamoxifen (Nolvadex), Taxol (paclitaxel), dan Taxotere (docetaxel). Kegagalan yang sering terjadi dalam usaha pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi, lebih dikarenakan rendahnya selektifitas obat-obat anti kanker dan sensitivitas sel kanker itu sendiri terhadap agen kemoterapi. Usaha penemuan obat baru yang aman dan selektif terhadap pengobatan dan pencegahan kanker dengan mengetahui pengaruh molekuler terhadap sel kanker perlu untuk dilakukan.

Pendekatan terapi kanker dapat dilakukan dengan menghambat perkembangan sel kanker tersebut baik melalui pemacuan apoptosis dan penghambatan daur sel yang dapat teramati secara *in vitro*. Proses terbentuknya sel kanker umumnya disebabkan oleh tidak terkendalinya proliferasi sel, maka pengembangan obat-obat antikanker dapat diarahkan pada regulasi daur sel dan kontrol *checkpoint* (Saphiro & Harper, 1999), faktor pertumbuhan dan signal faktor pertumbuhan (Gibbs^a, 2000), penghambatan angiogenesis (Keshet & Bens Sasson, 1999), dan pemacuan apoptosis (Fisher, 1994).

Salah satu strategi pengembangan obat anti kanker adalah penemuan senyawa baru yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen yang mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan kematian sel. Pengembangan obat antikanker dengan didasarkan pada regulasi *cell cycle* (Gambar 1) diarahkan pada penghambatan terjadinya proses pembelahan sel, sehingga senyawa ataupun protein yang diberikan kepada penderita dapat mencegah terjadinya sintesis DNA dan mitosis. Pada berbagai kasus kanker, sering ditandai dengan hilangnya pRb, inaktivasi p16INK4, amplifikasi Cdk-4 dan meningkatnya ekspresi Cyclin D1 yang akan memacu proliferasi sel kanker. Strategi pengembangan obat antikanker pada proses ini dapat diarahkan untuk menghambat Cyclin D1, aktivasi dan meningkatkan ekspresi p16INK4. Secara ringkas, strategi tersebut

sesuai dengan gambar 3 (Saphiro & Harper 1999). Sel kanker dapat dihambat pertumbuhannya pada fase G2M pada *cell cycle*. Sel mengalami pertumbuhan dan sintesis protein pada fase G2 sehingga cukup untuk kelangsungan hidup dua sel yang akan terbentuk dan siap untuk masuk ke fase M dan mengalami pembelahan menjadi dua sel yang identik. Penghambatan sel pada fase G2M ini dikaitkan dengan peningkatan ekspresi protein p21 Waf/CIP. Protein tersebut merupakan inhibitor siklus sel yang berperan penting pada regulasi siklus sel. Peningkatan ekspresi protein p21 tersebut terkait erat dengan terjadinya apoptosis pada sel. Ekspresi protein p21 dapat terjadi baik tergantung maupun tidak tergantung pada perubahan ekspresi protein p53 (Harper *et al.*, 1993; Michieli *et al.*, 1994; Zeng & El-Deiry *et al.*, 1996).



Gambar 1. Strategi menurunkan level cdk4 yang memodulasi progresi *cell cycle*

Kematian sel merupakan proses normal yang berfungsi untuk perbaikan jaringan dan penghilangan sel yang rusak yang mungkin berbahaya bagi tubuh. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram atau program bunuh diri sel yang memerlukan mRNA dan sintesis protein tertentu (King, 2000). Apoptosis dapat dipacu melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik yang melibatkan protein intraseluler *caspase*. Hal tersebut mendorong untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap ekspresi protein-protein yang terkait dengan regulasi siklus sel maupun apoptosis. Penelitian ini diarahkan untuk mengetahui pengaruh molekuler pada protein p53, p21, cdc-2, *caspase*-3/6/7/9 dan PARP serta PUMA

dan BAX yang terkait langsung dengan regulasi siklus sel fase G2M dan apoptosis.

B. Jati Belanda

Jati Belanda telah lama dikenal oleh masyarakat di dunia. Tanaman ini (Gambar 2) dikenal sebagai jati blanda (Sumatra); jati londo dan jatos landi (Jawa); Bastard cedar di Inggris; Orme d'amerique (Perancis) dan Guasima di Meksiko (Dep.Kes.RI., 2008). Kedudukan tanaman jati belanda dalam sistem tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	:	Magnoliophyta	
Kelas	:	Magniliopsida	
Anak kelas	:	Dilleniidae	
Ordo	:	Malvales	
Famili	:	Sterculiaceae	
Genus	:	Guazuma	
Species	:	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lamk.	(Anonim, 2009)



Gambar 2. Daun Jati Belanda

Kandungan kimia dalam tanaman ini dilaporkan dalam beberapa penelitian. adalah senyawa tanin dan musilago. Penelitian awal oleh tim menunjukkan kandungan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan polifenol (Melannisa *et al.*, 2011). Sukandar *et al.* (2009) melaporkan kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, dan terpenoid pada simplisia dan ekstrak air. Adanya cyanogenic glycosides telah diketahui pada tanaman ini (Seigler, 2005). Daun Jati Belanda termasuk salah satu dari 9 tanaman obat unggulan

yang sedang dikembangkan penelitiannya menjadi fitofarmaka menjadi penurun kolesterol dan antidiabetes (Dewoto, 2007). Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2008), kualitas ekstrak etanol daun Jati Belanda ditandai dengan kandungan flavonoid 3,2% (sebagai kuersetin) dan keberadaan senyawa tilirosida.

Tanaman Jati Belanda terutama bagian daunnya telah lama digunakan pada pengobatan tradisional dan telah banyak diteliti. Tanaman ini secara tradisional digunakan sebagai teh penurun berat badan; pengobatan beberapa penyakit seperti malaria, diare, raja singa, gangguan hati dan ginjal, serta wasir; dan dapat menstimulasi kontraksi rahim (Anonim, 2009). Ekstrak air dan ekstrak etil asetat daun Jati Belanda menghambat herpes bovine virus dan virus polio dengan metode *plague assay* (Felipe *et al.*, 2006). Aktivitas antibakteri ekstrak metanolnya terhadap *Escherichia coli* telah dibuktikan pada penelitian Tumbel (2009). Selain itu, ekstrak etanol daunnya terbukti dapat menghambat aktivitas lipase pankreas (Iswantini *et al.*, 2011) dan ekstrak airnya menurunkan kadar lipid pada tikus (Sukandar *et al.*, 2009). Aktivitas antidiabetes dari tanaman ini telah diteliti (Alonso-Castro & Salazar-Olivo, 2008). Ekstrak etanol daun Jati Belanda tidak bersifat toksik pada tikus (Utomo, 2008).

Potensi daun Jati Belanda terhadap aktivitas antikanker perlu untuk dieksplorasi lebih lanjut. Penelitian awal oleh tim membuktikan efek sitotoksik ekstrak etanol daun Jati Belanda pada sel kanker payudara T47D. Hasil ini sejalan dengan penelitian Nascimento (1990) pada sel KB. Senyawa *procyanidin B-2* yang diisolasi dari tanaman ini memperlihatkan aktivitas sitotoksik pada sel Raji dan sel melanoma tetapi tidak aktif terhadap sel kanker paru A-549 (Kashiwada *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 2002). Hasil uji sitotoksik menunjukkan tilirosida dapat menghambat pertumbuhan dua cell line yaitu: CCRF-CEM dan NAMALWA dengan IC50 berturut-turut 17,1 dan 16,1 µg/mL (Dimas *et al.*, 2000).

C. Pengembangan Tanaman Obat Tradisional sebagai Antikanker

Penggunaan obat-obat herbal mengalami peningkatan di seluruh dunia terutama di negara berkembang. Selain murah, penggunaan obat herbal dalam perawatan kesehatan untuk mencegah dan mengobati berbagai macam penyakit lebih mudah diterima oleh tubuh dengan efek samping yang minimal. Bukti ilmiah mengenai keamanan dan efektivitas terapi dengan produk herbal dapat

memperkuat penggunaannya sebagai alternatif dari pengobatan modern (Pal & Shukla, 2003). Penggunaan obat herbal untuk penyakit kanker juga mengalami peningkatan. Sekitar 7-48% pasien yang telah didiagnosis kanker menggunakan pengobatan herbal (Gratus, 2009). Penggunaan tanaman obat tersebut sering kali dikembangkan berdasarkan penggunaannya secara empiris atau berdasarkan kajian etnobotani-nya (Heinrich, 2003).

Sebagian besar penelitian tanaman obat telah diarahkan pada pemahaman yang lebih baik dari efek farmakologisnya selain kajian fitokimianya (Heinrich, 2003). Selain itu, perkembangan penelitian tersebut juga diarahkan untuk mendapatkan senyawa anti kanker baru yang berasal dari tanaman obat tradisional. Beberapa agen antikanker yang berasal dari tanaman seperti *vincristine*, *vinblastine* dan *taxol* telah terbukti efektif. Senyawa-senyawa tersebut mempunyai target molekuler spesifik pada penghambatan proliferasi sel kanker (Cragg & Newman, 2005).

Perkembangan penelitian mengenai pengobatan kanker berupaya untuk meningkatkan selektifitas dan keamanannya serta mengurangi efek samping pada sel normal. Peningkatan ilmu pengetahuan terkait mekanisme molekuler dan patofisiologi kanker manusia mendorong pengembangan obat antikanker pada target molekuler sehingga diharapkan dapat menghasilkan obat antikanker dengan efektifitas yang lebih besar dan toksisitas yang lebih rendah (Gibbs^b, 2000). Identifikasi agen antikanker selain didasarkan pada kajian etnobotani dan fitokimia tetapi juga berbasis uji sitotoksik secara *in vitro* dan *in vivo*. Kelemahan uji sitotoksik yang belum dapat menggambarkan kompleksitas kanker pada manusia dapat diatasi dengan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya biologi molekuler (Gibbs^b, 2000) sehingga penelitian dapat diarahkan target molekuler yang spesifik seperti sinyal transduksi, regulasi *cell cycle*, apoptosis dan angiogenesis (Hanahan & Wienberg, 2000).

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antikanker suatu senyawa atau bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Informasi yang didapat secara *in vitro* dapat menggambarkan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama. Metode MTT assay merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji sitotoksik. Metode ini mengukur proliferasi sel secara kolorimetrik dan telah diadopsi sebagai alat tes kolorimetri cepat untuk kelangsungan hidup sel (MTT

assay) dan dapat mengidentifikasi selektifitas senyawa uji berdasarkan respon sitotoksik dan resistensi pada berbagai jenis sel kanker (Chabner & Jr, 2005). Beberapa tanaman dapat memberikan respon pada beberapa sel kanker tertentu tetapi tidak pada sel yang lain. Penelitian Ueda *et al.* (2002) menunjukkan selektifitas *Cosciniium fenestratum* terhadap selektif terhadap sel kanker paru metastatik (A549 LLC dan B16-BL6), sementara *Hydnophytum formicarum* dan *Streptocaulan juvenas* menunjukkan aktivitas selektif pada sel kanker HeLa dan A549. Penelitian ini pada tahap awal akan ditujukan untuk mengetahui selektifitas ekstrak etanol daun Jati Belanda terhadap beberapa sel kanker seperti Hela, T47D dan MCF7.

Uji sitotoksik secara *in vitro* dapat dilanjutkan pada pengamatan seluler dan level molekuler untuk mengetahui target molekuler efek sitotoksik tersebut. Pengamatan perubahan dapat diarahkan pada target molekuler yang spesifik seperti sinyal transduksi, regulasi *cell cycle*, apoptosis dan angiogenesis. Adanya perubahan morfologi karakteristik dan fragmentasi DNA menunjukkan aktivitas antiproliferatif terjadi karena induksi apoptosis telah diamati pada penelitian beberapa tanaman obat (Ueda *et al.*, 2002). Mekanisme aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun Jati Belanda pada penelitian ini akan dimulai dengan pengamatan pada level seluler terhadap regulasi *cell cycle* dan apoptosis.

Penelusuran mekanisme molekuler dapat dilakukan dengan mengamati level ekspresi protein-protein tertentu (Kuo *et al.*, 2005; Malikova *et al.*, 2006). Regulasi *cell cycle* berdasarkan aktivasi *cyclins* dan *cyclin-dependent kinases* (CDKs) yang menginisiasi perpindahan sel dari fase G1 ke fase S dan dari fase G2 berlanjut ke mitosis. Kanker sering kali disebabkan aktivitas *cyclin-dependent kinase* yang tidak terkontrol oleh inhibitor *cell cycle* seperti p21 (Malikova *et al.*, 2006). Pengamatan ekspresi protein regulator *cell cycle* merupakan salah satu penelusuran mekanisme molekuler yang spesifik. Induksi apoptosis pada sel tumor dinilai sangat berguna dalam terapi dan pencegahan kanker. Berbagai bahan alam telah terbukti memiliki kemampuan menginduksi apoptosis pada sel kanker yang berasal dari manusia (Taraphdar *et al.*, 2001). Penelitian ini akan diarahkan pada penelusuran mekanisme molekuler dengan pengamatan ekspresi gen/protein dengan metoda immunositokimia dan *western blott* pada gen/protein yang terlibat pada regulasi siklus sel fase G2M seperti p53, p21 dan

cdc-2 serta protein-protein yang terlibat pada proses apoptosis seperti p53, BAX, PUMA, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8, Caspase-9 dan PARP.