

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Abortus

Abortus adalah terlepasnya atau dilepaskannya fetus atau embrio dari uterus pada usia trimester pertama gestasional (20 minggu atau kurang) dan dengan berat kurang dari 500 gr (Cunningham *et al*, 2005). Berikut ini informasi tentang abortus merupakan kejadian yang dialami responden dalam kurun waktu lima tahun terakhir, Badan Litbang Kesehatan, dalam laporan Riskesdas 2010 mengungkapkan bahwa angka kejadian abortus secara nasional adalah 4%. Kalau dilihat per provinsi, angka ini bervariasi mulai terendah 2,4% yang terdapat di Bengkulu sampai dengan yang tertinggi 6,9% di Papua Barat. Ada 4 provinsi yang mempunyai angka kejadian lebih dari 6% dengan urutan dari yang tertinggi yakni provinsi Papua Barat, Kalimantan Tengah dan Kalimantan Selatan masing-masing 6,3%, serta Sulawesi Selatan 6,1%. (Pranata , 2012)

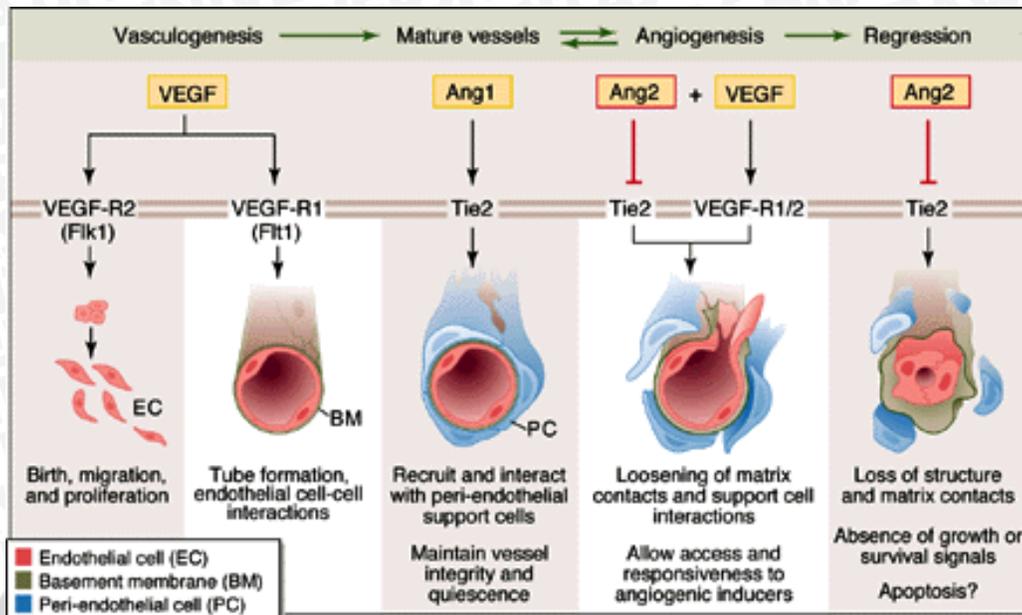
Ada beberapa tipe dan tahap abortus tergantung pada viabilitas fetus, yang pertama abortus *iminens*, dideskripsikan ketika ada pendarahan di awal kehamilan, biasanya serviks ditemukan masih dalam keadaan tertutup, pada tahap ini kehamilan masih mungkin berlanjut. Tahap kedua adalah abortus yang tak terelakkan deskripsinya adalah ketika terjadi pendarahan di awal kehamilan, biasanya dalam tahap ini serviks ditemukan terbuka yang menimbulkan kecurigaan janin akan keluar sehingga kehamilan tidak berlanjut. Tahap ketiga adalah abortus tidak komplit ketika abortus itu terjadi masih ada jaringan yang tertinggal di dalam rahim, serviks dalam tahap ini biasanya ditemukan sudah terbuka. Selanjutnya adalah tahap abortus komplit dimana janin sudah keluar dan rahim sudah kosong tidak tertinggal apapun dan serviks sudah tertutup. Tipe yang terakhir adalah *missed*

*abortus* ketika kehamilan berhenti berkembang dari beberapa minggu sebelumnya tetapi pendarahan baru terjadi saat ini. (Cunningham *et al*, 2005; Forder *et al*, 2009).

## 2.2 Angiogenesis

Angiogenesis adalah mekanisme pertumbuhan pembuluh darah. Mekanisme ini sangat penting untuk menentukan perkembangan berikutnya dari seorang janin. Pembuluh-pembuluh darah utama, seperti aorta dorsalis dan vena kardinalis, terbentuk melalui vaskulogenesis. Bagian lain dari sistem vaskular dibentuk oleh angiogenesis. Pola keseluruhan sistem ini dituntun oleh petunjuk-petunjuk yang melibatkan faktor pertumbuhan endotel vaskular (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) dan faktor pertumbuhan lainnya (Sadler, 2010).

Vaskulogenesis adalah pembentukan pembuluh darah *denovo* oleh diferensiasi sel-sel endotel dari prekursor mesoderm, yaitu angioblast. Hal ini terjadi dalam embriogenesis awal untuk membentuk pleksus kapiler primer. Penelitian menunjukkan kemungkinan peran prekursor endotel dalam membentuk pembuluh darah dalam kehidupan dewasa juga (Carmeliet, 2003). Ada mekanisme yang berbeda dari angiogenesis, yaitu tunas, intususepsi, perpanjangan dan penggabungan sirkulasi sel progenitor endotel ke dalam pembuluh yang sedang tumbuh (Gargett dan Rogers, 2001).

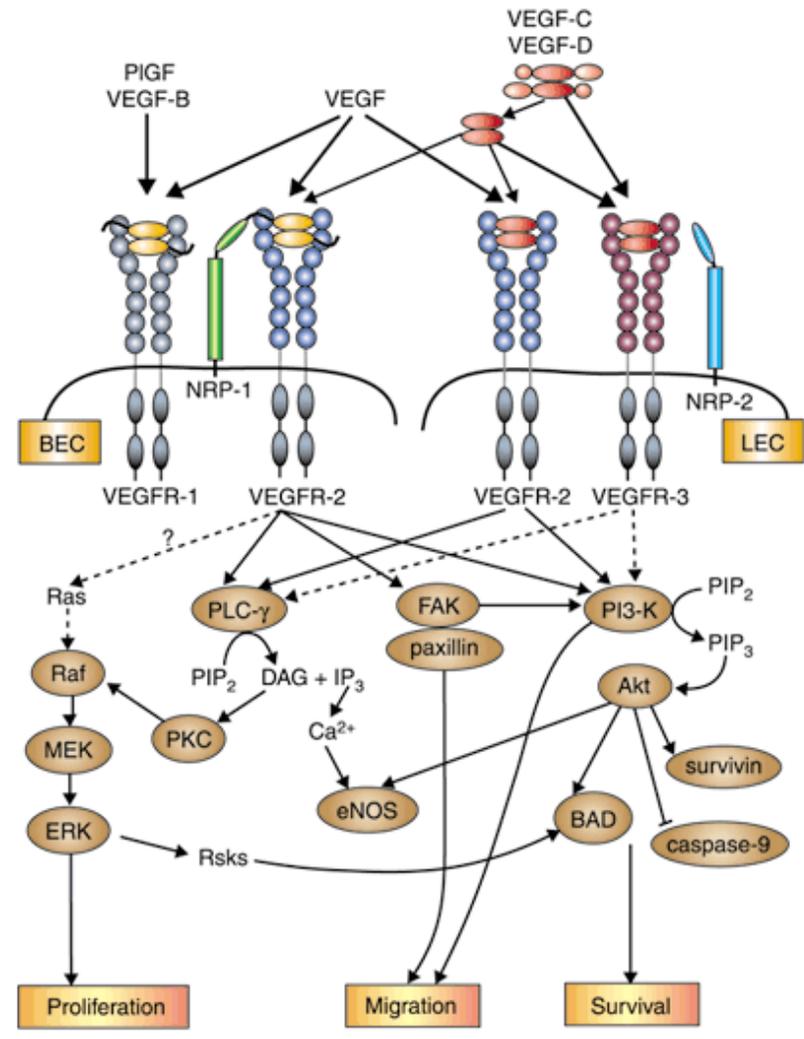


**Gambar 2.1** Vaskulogenesis dan angiogenesis (Kiselyov *et al*, 2007)

Pembentukan pembuluh darah diatur melalui keseimbangan antara stimulus angiogenik dan inhibitor angiogenik. Sel endotel yang sebagian besar dalam keadaan dorman. Setiap kali regulator positif mendominasi, sel-sel endotel menjadi aktif dan angiogenesis akan terjadi. Para regulator dapat berupa faktor fisik seperti hipoksia dan molekul seperti sitokin. Sitokin bertindak langsung pada sel endotel dengan mengikat reseptor atau secara tidak langsung menginduksi produksi regulator atau langsung oleh sel non-endotel. Selain itu, matriks ekstraseluler dan interaksinya dengan faktor pertumbuhan memainkan peran dalam regulasi angiogenesis (Adams dan Alitalo, 2007).

Ada tiga keluarga faktor pertumbuhan endotel vaskular spesifik : (1) keluarga VEGF (VEGF - A atau VEGF, VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D, VEGF - E dan faktor pertumbuhan plasenta PIGF (*Placental Growth Factor*), (2) keluarga angiopoietin (Ang1, Ang2, Ang3 dan Ang4), dan (3) keluarga ephrin (ephrin-B1, ephrin-B2 dan ephrin-A1). Ephrin-B2 ligan merupakan penanda untuk endotelium arteri dan

reseptor EphB4 menandai endotelium vena (Yancopoulos *et al*, 2000).



**Gambar 2.2** Overview VEGF dan VEGF Receptors (Karkkainen *et al*, 2002)

Selain perbedaan dalam pertumbuhan faktor itu sendiri, ada juga perbedaan antara reseptor dengan faktor pertumbuhan yang dapat berinteraksi, sehingga menyebabkan proses yang berbeda. VEGF adalah regulator vaskular dan dosis yang dipakai harus diatur secara spasial, temporal dan kuantitatif. VEGF mengikat reseptor spesifik pada membran sel endotel, sel menjadi aktif dan kaskade reaksi dimulai. Reseptor utama untuk keluarga VEGF adalah tirosin kinase, yaitu reseptor

faktor pertumbuhan endotel pembuluh darah VEGFR-1, VEGFR-2 dan VEGFR-3. Reseptor-reseptor ini terletak di transmembran dan disajikan selektif pada sel-sel endotel vaskular (Otrock *et al*, 2007). VEGFR-2 adalah reseptor yang menengahi tindakan pertumbuhan dan permeabilitas vaskuler VEGF sementara VEGFR-1 memiliki peran negatif, dengan bertindak sebagai reseptor *decoy*, karena memiliki fosforilasi tirosin yang lemah dalam menanggapi VEGF (Ferrara, 2004; Genetech, 2009; Meyer *et al*, 2006).

Pembentukan VEGF juga memainkan peran dalam pembentukan pembuluh darah. Angiopoietin mengikat juga keluarga reseptor tirosin kinase terutama dalam endotel pembuluh darah. Angiopoietin, terutama Ang1, mengikat terutama untuk Tie2, yang menstabilkan pembuluh darah dewasa. Antagonis Ang1, Ang2 diinduksi oleh endothelium yang akan direnovasi dan menstabilkan pembuluh darah (Yancopoulos *et al*, 2000). PIGF atau faktor pertumbuhan plasenta yang diekspresikan kuat dalam plasenta mamalia juga penting dalam *remodeling* vaskular dewasa. PIGF mengikat VEGFR-1 karena itu memiliki efek stimulasi yang lemah pada angiogenesis. Hal ini lebih mungkin untuk membentuk panjang dan cabang pembuluh darah (Ancar dan Chardonnens, 2003). VEGF-B tampaknya memiliki peran dalam vaskularisasi koroner dan pertumbuhan. VEGF-C berikatan dengan reseptor VEGFR-3 dan memainkan peran dalam pembentukan pembuluh limfatik. VEGF-D dan VEGF-E memiliki peran fisiologis yang masih belum diketahui (Yancopoulos *et al*, 2000). Selain itu, faktor pertumbuhan endotel vaskular non-spesifik juga diperlukan untuk pembentukan pembuluh darah, seperti keluarga faktor pertumbuhan fibroblast (FGF), keluarga faktor pertumbuhan transformasi (TGF) dan faktor pertumbuhan platelet (PDGF), yang semua memiliki peran dalam mendukung proses angiogenik (Donati dan Gozdzikiewicz, 2008; Yancopoulos *et al*, 2000).

Faktor fisik juga mempengaruhi angiogenesis baik secara langsung atau tidak langsung melalui interaksi dengan molekul regulator. Hipoksia mempengaruhi angiogenesis melalui faktor-faktor molekul yang berbeda, yang paling penting adalah *hypoxia-inducible factor-1 (HIF - 1 $\alpha$ )*, sebuah heterodimer dan tombol pengatur melalui pengikatan DNA dalam banyak proses angiogenesis. HIF-1 transkripsi meningkatkan gen hypoxia-inducible sehingga pembentukan VEGF, PDGF  $\beta$  (*Platelet Derived Growth Factor-  $\beta$* ), TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factors-  $\alpha$* ) dan erythropoietin (EPO) (George dan Kaelin, 2003). Dalam kondisi normal protein penekan tumor *von Hippel - Lindau (VHL)* berikatan dengan HIF-1 $\alpha$ , yang kemudian dihancurkan oleh proteolisis, sehingga mencegah aktivasi transkripsi gen target. Dalam kondisi hipoksia, HIF-1 $\alpha$  tidak terdegradasi dan dapat mengaktifkan gen target. Faktor ini memainkan peran penting dalam keganasan tumor melalui saklar angiogenik (Bradbury, 2001).

Hipoksia juga memainkan peran penting dalam plasenta dan vaskularisasi embrionik (Ancar dan Chardonnens, 2003). Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa pembentukan pembuluh darah yang disebabkan oleh VEGF menyebabkan kebocoran pembuluh darah dan pembuluh darah yang terbentuk belum matang, tapi pembentukan pembuluh darah yang disebabkan oleh HIF-1  $\alpha$  menyebabkan pembuluh darah stabil (Yancopoulos *et al*, 2000). Faktor fisik kedua adalah pH. Lingkungan mikro mayoritas tumor bersifat asam karena glikolisis anaerobik. Meskipun pertumbuhan mikrovaskuler dalam kondisi asam dengan tidak adanya faktor pertumbuhan lebih lambat dibandingkan dengan kondisi normal, efek stimulasi dari VEGF dan  $\beta$ -FGF pada angiogenesis ditingkatkan oleh pH rendah. Peningkatan VEGF pada sel endotel dan matriks ekstraseluler (ECM) dalam kondisi asam menunjukkan bahwa VEGF disimpan dalam ECM dan dilepaskan kembali saat nilai

pH netral (Burbridge *et al*, 1999; Goerges dan Nugent, 2003). Selain itu, transkripsi VEGF dapat ditingkatkan dengan pH asam (D' Arcangelo *et al*, 2000; Fukumura *et al*, 2001; Xu *et al*, 2002). Faktor fisik lainnya adalah stres yang disebabkan oleh aliran darah segera setelah jantung mulai berdetak (Kurz, 2000; Le Noble *et al*, 2004).

HIF diperlukan untuk meregulasi hipoksia. HIF memainkan peran kunci dalam pengembangan, proses fisiologis dan kondisi patologis seperti kehadirannya mempengaruhi kelangsungan hidup, perkembangan siklus sel dan metabolisme. Meskipun pertama diidentifikasi sebagai faktor transkripsi utama yang diaktifkan dibawah konsentrasi oksigen rendah, HIF merupakan faktor transkripsi kunci yang diaktifkan oleh sitokin, onkogen dan ROS (*reactive oxygen species*) dalam kondisi *normoxic*. HIF merupakan faktor heterodimerik terdiri dari subunit  $\alpha$  dan  $\beta$ . Meskipun HIF-1 $\beta$  tidak diatur oleh kadar oksigen, subunit HIF- $\alpha$  secara ketat dikontrol pada tingkat protein. Hal ini terjadi terutama melalui aksi bersama dari kelas enzim yang disebut Phd (*prolyl-hydroxylases*) yang mengkatalisis subunit *prolylhydroxylation of HIF- $\alpha$*  targetnya untuk VHL (protein von Hippel-Lindau) 26 *S-proteasomal* dependen degradasi. Enzim Phd membutuhkan molekul O<sub>2</sub>, 2-oksoglutarat, ion besi (Fe<sup>2+</sup>) dan asam askorbat untuk menjadi aktif sepenuhnya lalu menghambat kondisi hipoksia.

Empat Phd telah diidentifikasi sejauh ini, tapi hanya tiga, Phd 1, 2 dan 3, yang telah dibuktikan fungsional dalam hal modulasi HIF. Phd2 dianggap Phd dominan dalam mengendalikan HIF-1 $\alpha$  beserta hipoksia. Selanjutnya, ketiga Phd dapat diatur oleh HIF dan kadar oksigen. Sebagai tambahan mekanisme stabilisasi HIF- $\alpha$  dikontrol oleh *prolylhydroxylation*, *hydroxylation* dari Asn 803 dalam HIF-1 $\alpha$  atau Asn 851 di HIF-2 $\alpha$ , mencegah interaksi dengan domain CH1 dari *acetyltransferases histon (cAMP-respon-element binding protein)* yang bertindak

sebagai koaktivator transkripsi. Modifikasi ini mengubah kemampuan HIF-1/HIF-2 untuk mengtransaktivasi gen target mereka. Meskipun sebagian besar pengetahuan tentang HIF-1 telah berasal dari studi tentang stres hipoksia, stabilisasi HIF-1 juga telah ditemukan dalam pengaturan non hipoksia, seperti daerah tumor yang relatif baik oksigenasinya, dan penyakit seperti *rheumatoid arthritis* dan diabetes. Namun, mekanisme stabilisasi HIF dalam kondisi yang demikian belum dijelaskan. Banyak stimuli yang menyebabkan HIF-1 di *normoxia* dikenal untuk mengaktifkan sejumlah faktor transkripsi lainnya seperti NF- $\kappa$ B. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa *cross-talk* antara dua faktor transkripsi ini dapat terjadi. Selain itu, promotor PHD1 berisi NF- $\kappa$ B-*bindingsites* HIF-1 $\alpha$ , yang belum fungsional. Baru-baru ini terbukti NF- $\kappa$ B bergantung pada stabilisasi HIF-1 $\alpha$  dan induksi melalui H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serta kondisi yang normal.

NF- $\kappa$ B adalah nama kolektif untuk faktor transkripsi yang ada sebagai subunit hetero-orhomo-dimerandis disebut Rel A (p65), Rel B, Rel C, prekursor p50 dan prekursor p105 (NF- $\kappa$ B1), dan p52 beserta prekursor p100 (NF- $\kappa$ B2). Beberapa hetero-orhomo-dimerandis lebih umum daripada yang lain dan mereka *shuttle* antara sitoplasma dan nukleus tetapi sebagian besar diasingkan pada fase inaktif sitoplasma serta dihambat oleh inhibitor NF- $\kappa$ B. Setelah stimulasi oleh senyawa seperti TNF (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), onkogen atau sinar UV *signaling* hasil kaskade difosforilasi I $\kappa$ B, *signalling ubiquitination-mediated proteasomal degradation*, sehingga NF- $\kappa$ B dirilis dan ditranslokasikan ke nukleus. Kemudian NF- $\kappa$ B diaktifkan dengan mengikat urutan DNA target dalam inti dimana ia mengatur transkripsi NF- $\kappa$ B gen target. Meskipun aktivasi NF- $\kappa$ B sangat cepat, sifat siklik aktivitas NF- $\kappa$ B, dalam kombinasi dengan pasca-translasi kation modifikasi dan hiper histon dan hipo-asetat pada gen target adalah indikasi tingkat lebih lanjut dari

kompleksitas yang terjadi. Selain itu NF- $\kappa$ B juga bekerja sebagai promotor HIF- $\alpha$  (Uden *et al* ,2008).

Pelepasan ekspresi HIF dipengaruhi oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNos) dan COX-2 yang keduanya berkaitan erat dengan jalur NF- $\kappa$ B. iNos dan COX-2 menginduksi beberapa efek angiogenesis dan bersinergi dengan VEGF untuk permeabilitas vaskular yang terbentuk. Keduanya memproduksi NO dan PGE-2 yang diperlukan dalam perkembangan pembuluh darah untuk mengblok *N<sup>6</sup>-nitro-L-arginine methyl ester* dan indometasin yang menghambat perkembangan angiogenesis (Chiarugi *et al*, 1999).

### 2.2.1 Perbandingan umur embrio

Saat ini banyak metode yang digunakan untuk penelitian angiogenesis karena tidak memungkinkan untuk dilakukan langsung pada manusia. Di Indonesia sendiri masih jarang yang melakukan penelitian menggunakan embrio ayam.

Tabel 2.1 Data Perbandingan Umur Embrio (Spesies/Hari) (Hamburger and Hamilton, 1951; O'Rahilly, 1979; O'Rahilly and Muller, 1987 )

| Species         | Stage | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   |
|-----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Human</b>    | Days  | 20   | 22   | 24   | 28   | 30   | 33   | 36   | 40   | 42   | 44   | 48   | 52   |
| <b>Baboon</b>   | Days  | 23   | 25   | 27   | 28   | 29   | 30   | 31   | 33   | 35   | 37   | 39   | 41   |
| <b>Rhesus</b>   | Days  | 21   | 22   | 25   | 28   | 29   | 30   | 32   | 34   | 36   | 37   | 38   | 40   |
| <b>Monkey</b>   |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>Marmoset</b> | Days  | 57   |      | 60   |      | 64   |      | 67   |      |      |      | 74   |      |
| <b>Mouse</b>    | Days  | 9    | 9.5  | 10   | 10.5 | 11   | 11.5 | 12   | 12.5 | 13   | 13.5 | 14   | 14.5 |
| <b>Rat</b>      | Days  | 10.5 | 11   | 11.5 | 12   | 12.5 | 13   | 13.5 | 14   | 14.5 | 15   | 15.5 | 16   |
| <b>Chinese</b>  | Days  | 10   | 10.5 | 11   | 11.5 | 12   | 12.5 | 13   | 13.5 | 14   | 14.5 | 15   | 15.5 |
| <b>Hamster</b>  |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>Guinea</b>   | Days  | 14.5 | 15   | 15.5 | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |
| <b>Pig</b>      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>Rabbit</b>   | Days  | 8    | 8.5  | 9.5  | 10.5 | 11   | 12   | 12.5 | 13.5 | 14   | 14.5 | 15.5 | 16   |
| <b>Sheep</b>    | Days  | 15   | 16   | 17.5 | 18.5 | 19.5 | 20.5 | 22   | 23   | 24.5 | 25.5 | 27.5 | 29.5 |
| <b>Pig</b>      | Days  | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20.5 | 21.5 | 23   | 24   | 25.5 | 27.5 |
| <b>Chicken</b>  | Days  | 1    | 1.5  | 2    | 2.25 | 2.5  | 3    | 3.25 | 3.75 | 4.75 | 5.5  | 6.25 | 7.25 |
| <b>Dog</b>      | Days  |      |      |      |      |      | 27   | 28   | 29   | 30   | 34   | 36   | 37   |

### 2.3 Somitogenesis

Bentuk garis keturunan somitik dengan kepala mesoderm yang disebut mesoderm paraksial. Seri somitik dimulai anterior ekor dengan vesikel optik dan berjalan posterior pada kedua sisi tabung saraf dan notokord ke ujung ekor embrio. Dalam embrio ayam, somit muncul sebagai pasangan blok epitel sel pembentuk berurutan dari ujung rostral dari mesoderm presomitik mesensimal (PSM). Irama produksi somite adalah karakteristik dari spesies pada suhu tertentu. Dalam embrio

ayam, sepasang somite terbentuk setiap 90 menit pada 37°C dan total 52 somit pasangan terbentuk selama proses somitogenesis yang berlangsung dari hari 1 sampai hari ke-5 dari pertumbuhan. Somitogenesis dapat dibagi menjadi tiga fase utama. Pertama fase pertumbuhan selama sel-sel mesoderm paraksial baru diproduksi oleh zona pertumbuhan (epiblas dan kemudian streak primitif dan kemudian ekor) dan menjadi terorganisir sebagai dua batang jaringan mesensimal, membentuk PSM. Sel yang memasuki ekor PSM sudah disertai dengan beberapa informasi segmental. Kedua pola fase yang terjadi di PSM, dimana informasi segmental ini diterjemahkan ke dalam segmental pra-pola dalam PSM rostral. Ketiga, indentitas somite rostro-kaudal (RC) yang didirikan pada bagian paling rostral dari PSM segera diikuti oleh pembentukan batas somitik. Selama pematangan mereka di PSM, semua sel-sel mesoderm paraksial berturut-turut melalui fase-fase ini, yang diatur secara ketat di tingkat spasio-temporal (Pourquei, 2004).

#### 2.4 Suplemen

Menurut surat keputusan Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan tahun 1996, suplemen makanan didefinisikan sebagai produk yang digunakan untuk melengkapi makanan, mengandung satu atau lebih bahan makanan yaitu : vitamin, mineral, tumbuhan atau berasal dari tumbuhan, asam amino, bahan yang digunakan untuk meningkatkan kecukupan gizi, konsentrat, metabolit, konstituen, ekstrak/kombinasi dari beberapa bahan sebagaimana tercantum (Anggraini , 2009).

Menurut Geoffrey P.Webb (2006) definisi suplemen makanan secara umum, yaitu:

- a. Sesuatu yang dikonsumsi secara oral dalam dosis tertentu dalam bentuk pil, kapsul, bubuk dan cairan.

- b. Sesuatu yang diharapkan dapat ditambahkan ke dalam pola makan yang normal.
- c. Sesuatu yang telah dinyatakan dapat mempengaruhi kesehatan pada label kemasan maupun pada media promosi (brosur atau katalog) dan sesuatu yang termasuk ke dalam tiga kategori :
  - a. Mengandung zat gizi penting, seperti vitamin, makro mineral, mikro mineral, asam lemak esensial dan asam amino.
  - b. Mengandung zat metabolit alami dan atau secara alami terkandung di dalam makanan tetapi tidak termasuk ke dalam zat gizi utama.
  - c. Beberapa tambahan yang berasal dari ekstrak tumbuhan ataupun hewan yang mengandung unsur-unsur gizi tertentu yang mengandung unsur-unsur zat gizi atau secara farmakologi dinyatakan dapat memberikan efek bagi kesehatan seperti bawang putih, ginseng dan royal jelly.

Suplemen bromelain sendiri efektif digunakan untuk nyeri lutut, mengurangi pembengkakan setelah *injury* atau operasi, inflamasi, *hay fever*, dan mencegah kanker menurut beberapa artikel kesehatan (Webb, 2006).

## 2.5 Bromelain

Bromelain adalah ekstrak dari air nanas (*Ananas comosus*) yang mengandung campuran kompleks protease tiol dan komponen *non-protease*. Protease merupakan komponen utama pada nanas diantaranya: *stem* bromelain (80%), bromelain buah (10%), dan ananain (5%). Komponen non-protease adalah fosfatase, glukosidase, peroksidase, selulase, glikoprotein dan karbohidrat. Zat ini dapat berfungsi sebagai agen anti inflamasi, agen anti tumor dan penghambat

pembentukan trombus. Anti tumor disini melibatkan jalur NF-kB yaitu menghambat pengeluarannya. NF-kB itu sendiri menyebabkan supresi tumor karena target nya adalah COX-2, yang berperan dalam inflamasi kronik dan kanker (Tochi *et al*, 2008).

Beberapa studi menyebutkan bahwa bromelain tidak hanya menghambat aktivasi NF-kB tetapi juga fosforilasi AKT, ERK1/2 dan p38-MAPK juga. AKT, ERK12 dan p38-MAPK yang merupakan komponen protein-protein penting yang meregulasi angiogenesis, pertumbuhan regulasi, migrasi dan keberhasilan hidup sel endotelial (Mohr, 2013).

Tes untuk komponen protease individual bromelain baru-baru ini didirikan dengan demikian meningkatkan kemungkinan standardisasi persiapan bromelain. Bromelain dapat diserap dalam usus manusia tanpa degradasi dan tanpa kehilangan aktivitas biologisnya. Percobaan pada tikus menunjukkan bahwa antasida seperti natrium bikarbonat melestarikan aktivitas proteolitik bromelain dalam saluran pencernaan. Bromelain ditoleransi dengan baik pada dosis tinggi (sampai dengan 3 g/hari) untuk berkepanjangan periode terapi, bahkan hingga beberapa tahun. Bukti untuk kegiatan anti-kanker bromelain berasal dari pengamatan tradisional (di Asia Tenggara), studi dan model berbasis sel hewan dan studi klinis anekdot. Aktivitas anti-kanker bromelain disebabkan terutama oleh komponen proteasenyanya. Sejauh ini, bromelain sebagai pengobatan kanker belum menjadi subjek studi acak klinis terkontrol (Chobotova *et al*, 2010).

Studi klinis bromelain yang dilakukan pada tahun 1970 menawarkan bukti awal menunjukkan efektivitas dosis tinggi bromelain (1-2,4 g/hari) untuk mengobati beberapa jenis kanker, termasuk payudara dan ovarium. Sebagian besar bukti lain untuk kegiatan anti-kanker bromelain berasal dari *in vivo* yang melibatkan model kanker tikus serta dari pengamatan *in vitro* sel manusia dan tikus (kanker dan

normal) diobati dengan persiapan bromelain (Chobotova *et al*, 2010). Studi-studi lainnya dibahas di bawah ini. Studi klinis bromelain lebih jauh pada kanker adalah uji klinis bromelain menunjukkan efektivitasnya untuk mengobati berbagai kondisi berbasis peradangan. Ini termasuk pembengkakan payudara selama menyusui (Snowden *et al*, 2001), osteoarthritis lutut dan pinggul (Brien *et al*, 2006 ; Klein *et al*, 2006), rinosinusitis (Guo *et al*, 2006), sepsis pada anak-anak (Shahid *et al*, 2002) dan peradangan urogenital (Lotti *et al.*, 1993). Menariknya, tidak ada efek bromelain diamati dalam pengobatan peradangan yang terkait dengan kekambuhan multiple sclerosis, yang menunjukkan kekhususan target bromelain. Penelitian lain menunjukkan efek antitrombotik, fibrinolitik, sifat antiedematous bromelain dan berfungsi *debridement* (Orsini, 2006).

Bromelain sudah banyak dipakai dalam penelitian *in vivo* dan *in vitro* sebagai antiedema, antiinflamasi, antitrombotik dan juga dapat mempengaruhi aktivitas fibrinolitik. Berkaitan dengan efikasinya setelah penggunaan secara oral, bromelain aman dikonsumsi dan jarang ditemukan efek samping yang mengganggu karena itu bromelain dapat diterima sebagai obat fisioterapi. Dalam dunia kedokteran sudah banyak juga keuntungan terapi bromelain yang sudah dibuktikan seperti inhibisi agregasi platelet yang reversibel, terapi angina pectoris, bronkitis, sinusitis, trauma bedah, thromboflebitis, pielonefritis dan membantu penyerapan obat antibiotik (Maurer, 2001).

Meskipun dalam penelitian ini bukan dalam kondisi kanker, studi ini tetap sangat penting bagi pemahaman tentang aktivitas anti-kanker bromelain itu. Terdapat penelitian yang telah menetapkan bahwa peradangan kronis, penekanan kekebalan serta deregulasi dari sistem hemostatik yang terlibat dalam karsinogenesis. Studi-studi ini, memungkinkan seseorang untuk berspekulasi bahwa

target bromelain terlibat secara langsung dalam inisiasi, pertumbuhan dan perkembangan kanker. Sebelumnya, terapi adjuvant dengan protease eksternal telah menghasilkan hasil yang positif dalam mengobati kanker, mengurangi efek samping terapi dan memperpanjang kelangsungan hidup (Tochi *et al*, 2008).

Selain itu ada penelitian lain yang mengatakan tentang penelitian menggunakan embrio mencit untuk penelitian efek bromelain yang dikombinasikan dengan papain untuk penelitian prenatal ontogenesis. Dosis bromelain yang digunakan bervariasi mulai dari 3 mg-6,7 mg yang diuji pada berbagai dosis (Schmidt, 1995). Ada juga penelitian mengenai perkembangan skeleton fetus mencit setelah pemberian ekstrak buah nanas muda. Ekstrak kasar yang digunakan mengandung bromelain tapi kurang dijelaskan mengenai besar kandungannya hanya dosis yang digunakan bervariasi dengan ekstrak 0 %, 20 % (2 ml ekstrak dengan 8 ml akuades), 40 % (4 ml ekstrak dengan 6 ml akuades) dan 80 % (8 ml ekstrak dengan 2 ml akuades) ekstrak buah nanas muda yang diberikan secara oral melalui induk mencit yang hamil (Setyawati *et al*, 2011).

Pada dunia pre klinik selain studi *in vivo* juga banyak penelitian yang bervariasi mulai studi *in vitro*, eksperimen hewan yang kebanyakan adalah mencit, observasi klinik sampai studi kontrol bromelain memiliki manfaat untuk mencegah pembentukan edema dan mengurangi edema yang sudah ada, mengurangi kadar fibrinogen dalam darah, membantu fibrinolisis, mengaktifasi plasmin, memperpanjang waktu protrombin dan sebagian tromboplastin, menghambat agregasi platelet, mencegah penempelan platelet pada se-sel endotel pembuluh darah, mengurangi kadar plasmakinin, mengurangi kadar prostaglandin E2 dan tromboksan A2 dalam eksudat pada inflamasi akut, berperan sebagai agen antiinflamasi, menginduksi sekresi *interleukin (Il) -1, Il-6, Il-8* dan *tumor necrosis*

*factor (TNF)-  $\alpha$*  dari monosit dan granulosit darah, membantu pembakaran oksidatif dan granulosit sitotoksik melawan sel-sel tumor, meningkatkan permeabilitas jaringan obat-obat antibiotik, menunjang debridement kulit pada luka bakar ( Maurer ,2011). Studi *in vitro* dan *in vivo* mengenai efek pemberian bromelain pada konsentrasi prostaglandin E2 pada eksudat inflamasi perlakuan pada tikus. Dosis yang diberikan 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g dan 100  $\mu$ g juga menunjukkan hasil yang signifikan mengurangi konsentrasi prostaglandin E2 (Gaspani *et al*, 2001).

Mekanisme bromelain dalam mengganggu angiogenesis melibatkan faktor nuklir  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur respon inflamasi , sistem kekebalan tubuh, proliferasi sel dan apoptosis. Hubungan antara NF- $\kappa$ B dan peradangan telah ditunjukkan dalam beberapa studi dari berbagai penyakit manusia dan model hewan. Aktivasi jalur NF- $\kappa$ B telah diidentifikasi, sehingga penghambatan NF- $\kappa$ B dianggap menjadi alternatif terapi yang efektif pada penyakit inflamasi dan kanker. NF- $\kappa$ B juga langsung mengaktifkan pro-survival jalur, yang menyebabkan transformasi neo-plastik, meningkatkan ekspresi COX-2 yang diinduksi oleh IL-1 dan TNF- $\alpha$  dan promosi karsinogenesis. Peran NF- $\kappa$ B dalam peradangan telah ditunjukkan dalam beberapa studi dari berbagai penyakit manusia seperti kanker, asma, rheumatoid arthritis, aterosklerosis dan penyakit radang usus. NF- $\kappa$ B meningkatkan peradangan dengan menginduksi transkripsi sitokin pro-inflamasi, reseptor sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan enzim seperti matriks metalloproteinase (MMP), *cyclo-oxygenase-2* (COX-2), dan oksida nitrat diinduksi (iNOS) (Khiong *et al*, 2009).

Ada bukti yang menunjukkan akumulasi peran NF- $\kappa$ B *signaling* dan over-ekspresi dalam banyak jenis kanker. Bukti yang muncul juga menunjukkan bahwa tergantung pada konteks sel, NF- $\kappa$ B juga dapat mempromosikan penekanan tumor.

Di antara beberapa gen target NF- $\kappa$ B adalah COX-2, kunci dalam peradangan kronis dan kanker. COX-2 terlibat dalam sintesis prostaglandin E2 (PGE2), lipid pro-inflamasi yang juga bertindak sebagai immunosupresan dan promotor perkembangan kanker. Dengan memfasilitasi konversi asam arakidonat menjadi PGE2, COX-2 ditunjukkan dapat mempromosikan angiogenesis tumor dan perkembangan tumor. Obat atau zat yang dapat menghambat NF- $\kappa$ B, COX-2 dan aktivitas PGE2 dianggap memiliki potensi sebagai pengobatan kanker dan penyakit peradangan kronis (Chobotova *et al*, 2010).

