

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

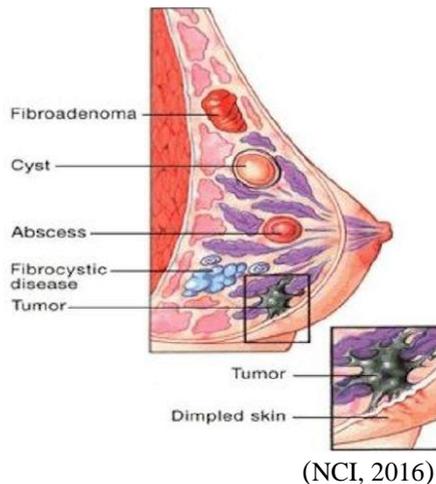
#### **2.1 Kanker Payudara dan Perkembangannya**

Kanker merupakan sekelompok sel yang digolongkan sebagai suatu penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan abnormal sehingga dapat bersifat menginvasi dan dapat menyebar ke wilayah lain dalam tubuh (Pecorino, 2012). Kanker muncul dari satu sel yang telah mengalami mutasi sehingga pada tahap awal akan menyebabkan sel-sel menghasilkan klon genetik yang homogen. Mutasi tambahan yang terjadi selanjutnya akan meningkatkan potensi pertumbuhan sel sehingga subkoloni dalam tumor masing-masing akan berkembang dengan sifat yang berbeda sehingga menghasilkan adanya tumor heterogen (Macdonald dkk., 2004).

Kanker dihasilkan dari serangkaian peristiwa molekuler yang secara mendasar mengubah sifat normal dari suatu sel. Penonaktifan dari suatu kontrol normal dalam sel mengakibatkan pertumbuhan berlebih dari sel sehingga dapat menginvasi jaringan lainnya. Sel-sel terus-menerus membelah dan tumbuh tanpa membutuhkan sinyal khusus untuk menginduksi pertumbuhan dan pembelahan selnya. Sel-sel yang terus membelah tersebut akan berkembang dengan karakteristik baru termasuk perubahan struktur sel, penurunan adhesi sel dan produksi enzim baru. Perubahan-perubahan tersebut diwariskan pada sel-sel baru yang terus-menerus dihasilkan sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel-sel normal di sekitarnya dan memungkinkan sel-sel kanker menyebar dan menyerang jaringan lain. Kelainan pada sel-sel kanker biasanya merupakan hasil dari mutasi *protein-encoding gen* yang mengatur pembelahan sel. Hal ini dikarenakan mutasi pada gen yang menghasilkan protein untuk memperbaiki kerusakan DNA tidak berfungsi secara normal. Peningkatan peristiwa mutasi dalam sel menyebabkan kelainan lanjut dalam sel dan sel anakan (Residcovering Biology, 2016).

Kanker payudara merupakan salah satu kanker yang paling umum terjadi pada wanita dan menjadi penyebab kematian pada sekitar 20% dari semua wanita yang meninggal karena kanker di negara-negara maju. Kanker payudara merupakan tumor ganas yang tumbuh dalam jaringan payudara. Tumor tersebut dapat berasal dari kelenjar atau jaringan di sekitar payudara. Kanker ini memiliki kemampuan berproliferasi yang tidak cepat namun dapat digolongkan dalam

kategori berbahaya. Jumlah penderita kanker payudara akan terus mengalami peningkatan hingga mencapai lebih dari satu juta pasien baru tiap tahun dan sekitar 350.000 pasien berasal dari wilayah Asia. Nilai rata-rata peristiwa kanker payudara di Indonesia adalah 36,2 per 100.000 populasi dan hal ini berpotensi menjadi masalah kesehatan yang besar dengan jumlah penduduk Indonesia yang tergolong tinggi (Nichols dkk., 2005).



(NCI, 2016)  
Gambar 1. Jenis-jenis kanker payudara

Beberapa faktor yang berperan dalam proses pembentukan kanker payudara diantaranya adalah keberadaan gen p53, gen BRCA1 dan gen BRCA2 (Hahn & Payne, 2003). Faktor lain yang berperan dalam memicu kanker payudara adalah keberadaan hormon estrogen yang abnormal, onkogen (gen pemicu pembelahan sel secara berlebih), hilangnya gen supresor untuk tumor, dan keberadaan bahan karsinogen (Warren, 2002).

## 2.2 *Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (NRF2) Pathway*

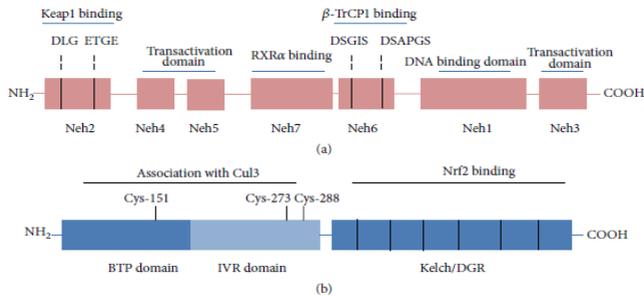
Jalur NRF2 merupakan salah satu mekanisme pembentukan antioksidan yang berperan dalam proses penanggulangan ROS dalam

tubuh. *Nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (NRF2) adalah faktor transkripsi yang memegang peran kunci dalam proses regulasi redoks selular (Malhotra dkk., 2010). NRF2 memiliki tujuh domain fungsional bernama *NRF2-ECH homology* (Neh) seperti pada Gambar 2. Domain Neh1 memiliki struktur *leucine zipper* yang berperan dalam pembentukan *dimer* dengan Maf dan mengikat *antioxidant/ electrophile responsive elements* (ARE / EpRE). Neh2 adalah domain utama peraturan negatif yang berperan dalam pengikatan *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) melalui jalur DLG dan ETGE. Neh3 yang terdapat pada region C terminal NRF2 berperan sebagai domain *transactivation* yang merekrut protein *kromo-ATPase / chromo-ATPase/helicase DNA binding protein family* (CHD6), sedangkan kedua Neh4 dan Neh5 merupakan domain *transactivation* yang merekrut elemen respon cAMP *response element binding protein-* (CREB-) *binding protein* (CBP) atau *the receptor-associated coactivator* (RAC). Neh6 adalah domain dari NRF2 degradasi KEAP1-independen melalui perekrutan oleh DSGIS dan DSAPGS yang mengandung protein  $\beta$ -*transducin* ( $\beta$ -TrCP). Domain Neh7 berperan dalam interaksi dengan reseptor *alpha retinoid X* (RXR $\alpha$ ) yang merupakan represor dari NRF2 (Furfaro dkk., 2016).

Mekanisme pengaktifan gen oleh NRF2 ditunjukkan pada Gambar 3. NRF2 secara normal akan didegradasi oleh KEAP1. KEAP1 adalah regulator kunci dari jalur sinyal NRF2 dan berfungsi sebagai saklar molekuler untuk *switch on* dan *switch off* dari *pathway* NRF2/KEAP1-ARE. Modifikasi oksidatif akan terjadi pada salah satu sistein KEAP1 apabila jumlah stress oksidatif berlebih dalam tubuh, sehingga NRF2 akan berhasil lolos dari jalur proteolitik ini dan akan bertranslokasi ke nukleus untuk membentuk *dimer* dengan protein Maf dan mengikat ARE. Interaksi tersebut akan menghasilkan antioksidan sebagai respon adanya oksidatif tersebut. Dalam kondisi patologis, degradasi NRF2 akan berlangsung di sitoplasma setelah dilepaskan dari KEAP-1 dan NRF2 tidak bertranslokasi ke nukleus (Taha dan Blasie, 2014).

NRF2 dapat berperan dalam meningkatkan atau menurunkan aktivitas transkripsi berbagai gen dan juga mungkin dapat menekan beberapa gen melalui efek langsung pada transkripsi. Aktivasi gen antioksidan melalui mekanisme NRF2 salah satunya adalah pada gen *heme oxygenase 1* (HO-1) yang mengubah heme bebas yang

memiliki efek pro-oksidan menjadi besi, karbon monoksida (CO) dan *biliverdin* (Pall & Levine, 2015).

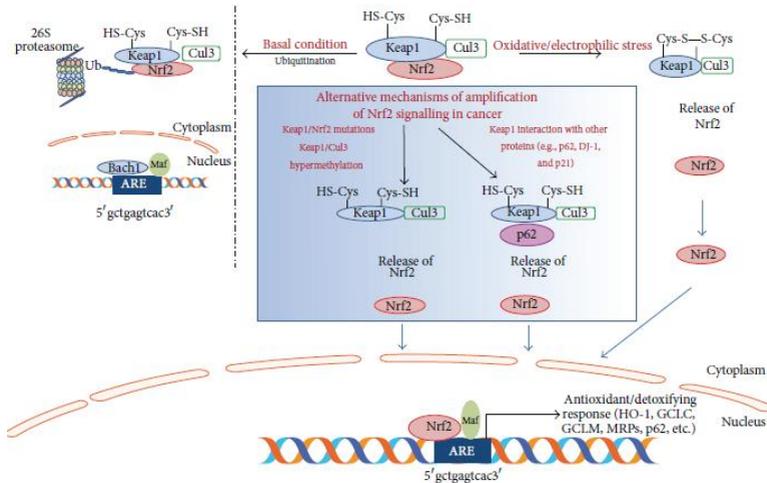


(Furfaro dkk., 2016)

Gambar 2. Skema representasi dari struktur NRF2 dan KEAP1. Keterangan: (a) Domain NRF2 (b) Domain KEAP1

Gen antioksidan lain yang diaktifkan oleh NRF2 adalah *quinone oxidoreductase gene* (NQO1) yang menghasilkan enzim untuk mencegah *semiquinone redox cycling* akibat stres oksidatif dan *superoxide dismutase genes* (SOD-1 dan SOD2) yang berperan dalam menurunkan stres oksidatif dengan menurunkan superoksida yang terkait dengan katalase dan dua gen *glutathione peroxidase* (Pall & Levine, 2015).

NRF2 tidak hanya berperan dalam melindungi sel normal bertransformasi menjadi sel kanker, namun NRF2 juga mampu menginduksi survival terhadap sel kanker melalui *deleterious environment*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa keterlibatan NRF2 pada proses *cancer promotion* diketahui saat ditemukannya ekspresi NRF2 dan GSTP1 yang tinggi selama proses perkembangan karsinoma hepatoselular. Penemuan lainnya juga mengindikasikan bahwa NRF2 memiliki peran positif terhadap tumorigenesis kanker dan *chemoresistance*. Hal ini dapat terjadi karena adanya ekspresi berlebihan dari NRF2 yang disebabkan oleh mutasi pada KEAP1 atau hilangnya *heterozygosity* pada lokus KEAP1 (Lau, 2008).



(Furfaro dkk., 2016)

Gambar 3. Regulasi aktivasi NRF2

### 2.3 Heme Oxygenase-1 (HO-1)

*Heme oxygenase-1* (HO-1) merupakan *rate-limiting enzyme* yang berperan dalam mengkatalisis degradasi oksidatif dari *heme* sehingga dapat membebaskan ikatan *free iron*, karbon monoksida (CO) dan biliverdin dalam sel mamalia. Peran penting lainnya dari HO1 adalah sebagai antioksidatif dan antiinflamasi masing-masing melalui aktivitas oleh biliverdin dan CO. HO1 banyak diekspresikan pada berbagai kondisi penyakit termasuk kanker. Beberapa penelitian membuktikan bahwa HO1 dapat menginduksi proses karsinogenesis dan perkembangan tumor. Tingkat ekspresi HO1 yang tinggi pada sel kanker dapat berperan dalam pertahanan dan induksi proliferasi terhadap sel kanker tersebut. HO1 diketahui juga dapat menginduksi angiogenesis melalui modulasi ekspresi faktor angiogenesis. HO1 tergolong sebagai *endoplasmic reticulum resident protein*, namun pada sel-sel tumor dalam jaringan kanker diketahui bahwa HO1 banyak ditemukan di dalam inti sel. Hal ini membuktikan bahwa HO1 rentan terhadap *proteolytic cleavage* dan bertranslokasi menuju inti sel untuk memfasilitasi pertumbuhan tumor. HO1 dapat menstimulasi perkembangan tumor melalui modulasi pada *microenvironment* tumor tersebut (Chau, 2015).

## 2.4 *Superoxide Dismutase-1 (SOD1)*

Pertahanan pertama sel terhadap ROS yang dapat menginduksi kerusakan DNA dengan mengkonversi superoksida menjadi hidrogen peroksida adalah enzim antioksidan *superoksida dismutase* (SOD). SOD pada mamalia diketahui terdapat dalam tiga bentuk berbeda yaitu *copper-zinc supeoxide dismutase* (Cu/ZnSOD atau SOD1) yang berada di sitoplasma, *manganese superoxide dismutase* (MnSOD atau SOD2) yang berada di mitokondria dan *extracellular superoxide dismutase* (ECSOD atau SOD3) yang banyak ditemukan di daerah ekstraselular (Singh & Bhat, 2012; Milani dkk., 2013). SOD1 berukuran 32 kDa *homodime* dari 153-*residue polipeptide* dengan satu *copper-* dan satu *zinc-binding site* per subunit. Tiap monomer secara spesifik memiliki sebuah  $\beta$ -*barrel motif* dan dua *loop* besar yang disebut *electrostatic* dan *zinc loop* yang menyelubungi *region metal-binding*. Region tersebut merupakan region yang mengkatalisasi reaksi *superoxide anion* ( $O_2^-$ ) menjadi oksigen ( $O_2$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) pada *bound cooper ion* (Milani dkk., 2013).

SOD1 juga memiliki peran yang cukup penting dalam proses perkembangan tumor. SOD memiliki peran dalam proses tumorigenesis pada payudara serta menginduksi tumor pada payudara. Peningkatan resisten kanker payudara terhadap stress oksidatif akan meningkatkan aktivitas SOD1 pada sel kanker payudara. Hal yang sama juga terjadi pada induksi sel kanker payudara MCF-7 yang diberi stres oksidatif dan E2 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi SOD1 dan penurunan tirosin nitras (Rao dkk., 2008).

## 2.5 *Tapak Liman (Elephantopus scaber)*

Tanaman tapak liman (*Elephantopus scaber*) merupakan tanaman obat yang telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat dari beberapa jenis penyakit. Tanaman ini diduga berasal dari daerah tropis Amerika dengan ketinggian tempat kurang dari 1200 m di atas permukaan laut. Tapak liman merupakan tanaman gulma yang banyak ditemukan di alam bebas seperti padang rumput (Yuniarti, 2008).

Tapak liman tergolong dalam jenis tanaman terna tegak dengan rimpang menjalar yang ditunjukkan pada Gambar 5. Tinggi tanaman ini berkisar antara 10-80 cm dengan batang kaku, berbulu panjang

dan rapat. Daun membentuk roset dengan bentuk jorong dan permukaan agak berbulu. Panjang daun sekitar 3-8 cm dengan lebar berkisar antara 1-6 cm (Yuniarti, 2008).

Menurut Compleat Botanica (2004), klasifikasi tanaman tapak liman sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: <i>Elephantopus</i>
Spesies	: <i>Elephantopus scaber L.</i>

*Elephantopus scaber L.* memiliki kandungan flavonoid, triterpenoid, flavonoid ester dan sesquiterpen lakton. Sesquiterpen lakton adalah senyawa penting yang berperan sebagai antitumor dengan menginduksi apoptosis pada sel tumor. *Deoxyelephantopin* (ESD) dan *isodeoxyelephantopin* (ESI) merupakan dua jenis *sesquiterpene lactones* yang diketahui dapat menstimulasi apoptosis dan menghambat invasi pada sel kanker (Ichikawa dkk., 2006).

Flavonoid dalam tanaman tapak liman juga dapat berperan sebagai antikanker. Hal ini dikarenakan aktivitas antioksidan dalam mengikat radikal bebas dan untuk mencegah inisiasi, promosi serta perkembangan perkembangan kanker melalui interaksi selektif dengan protein kinase *signaling cascades* yang terlibat dalam pertahanan sel (Bennett dkk., 2012). Flavonoid yang banyak terdapat dalam tanaman *E. scaber* diantaranya adalah quercetin, apigenin, rutin, *aglycoside luteolin*, *flavonoid glycosides luteolin-7-oglucuronide 6-methyl ester* dan *luteolin-4-O-β-D glucoside* (Mendhulkar & Kharat, 2015).

Salah satu flavonoid yang mampu meningkatkan aktivitas NRF2 adalah quercetin dengan beberapa mekanisme. Quercetin dapat mengaktivasi NRF2/ARE dengan meningkatkan *the steady-state level* dari NRF2 melalui regulasi transkripsi, meningkatkan *the steady-state level* dari NRF2 melalui penghambatan ubiquitinasi dan protein *the steady-state level* pada saat *posttranscriptional* serta pada waktu yang bersamaan quercetin juga menurunkan *the steady-state level* dari protein KEAP1 pada saat *posttranscriptional* (Tanigawa dkk, 2007).

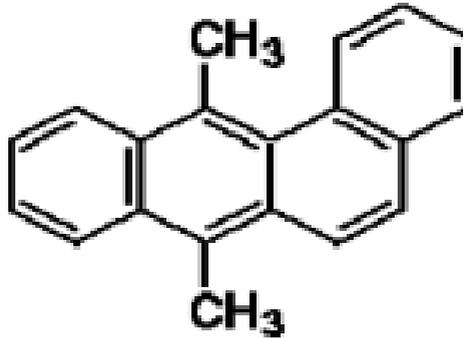


(Ho dkk., 2009)

Gambar 4. Struktur morfologi tapak liman (*Elephantopus scaber*)

## 2.6 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)

7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA) merupakan salah satu senyawa karsinogenik yang tergolong dalam kelas hidrokarbon poliaromatik (PAH) yang memiliki beberapa kemiripan dengan senyawa estrogen (Gambar 5). DMBA merupakan senyawa prokarsinogen yang jika termetabolis oleh sitokrom P-45 akan menjadi metabolit aktif yang mampu membentuk *DNA adduct* pada DNA sehingga memiliki kemampuan dalam menstimulasi terjadinya perkembangan sel malignan (kanker) (Lenoir dkk., 2005)



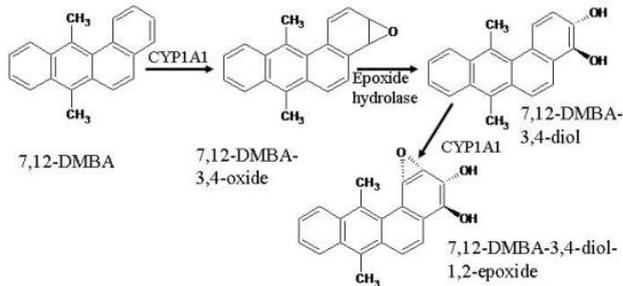
(Sigma, 2017)

Gambar 5. Struktur DMBA (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene)

Interaksi antara DNA dan senyawa karsinogen hidrokarbon (DMBA) yang dikatalisis oleh enzim seperti enzim hidroksilasi dalam liver akan mengubah konformasi dari senyawa *benzo[a]pyrene* menjadi senyawa aktif intermediet sehingga senyawa karsinogen tersebut dapat berikatan dengan DNA secara kovalen seperti pada Gambar 6 (Wibowo dkk., 2010). DMBA banyak digunakan sebagai senyawa karsinogen dalam proses permodelan kanker karena DMBA merupakan senyawa yang dapat dengan cepat membentuk *DNA adduct* dan sebagian besar penelitian tentang perkembangan proses karsinogenesis menggunakan senyawa DMBA memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi serta dapat berikatan dengan *arylhydrocarbon* (AhR) yang banyak terdapat pada kelenjar reproduksi seperti kelenjar payudara. AhR banyak diekspresikan pada saluran reproduksi pada beberapa spesies dan dapat mengindikasikan bahwa AhR memiliki peran penting terhadap fisiologi dari sistem reproduksi (Pocar dkk. 2005).

Enzim yang berperan mengkatalisis metabolit tersebut adalah enzim *cyclophilin* (CYP) seperti CYP1A1 dan CYP1B1 pada jaringan perifer (seperti jaringan payudara) dan CPY1A2 pada hati (Lenoir dkk., 2005). *The Phase I drug-metabolizing enzyme cytochrome P450* (CYP) 1A1 merupakan protein yang dikode oleh *ARE gene battery* dan diinduksi pada sel setelah adanya paparan senyawa endogen dan xenobiotik yang merupakan ligan untuk *aryl-*

*hydrocarbon receptor* (AhR) (Whitlock, 1999; Nguyen dkk., 2003). *The antioxidant response element* (ARE) adalah *cis-acting enhancer sequence* yang memediasi proses aktivasi transkripsi sel pada sel yang terpapar oleh stres oksidatif (Nguyen dkk., 2003). Mekanisme aktivasi ARE oleh faktor transkripsi berupa NRF2 dapat dilihat pada Gambar 7.

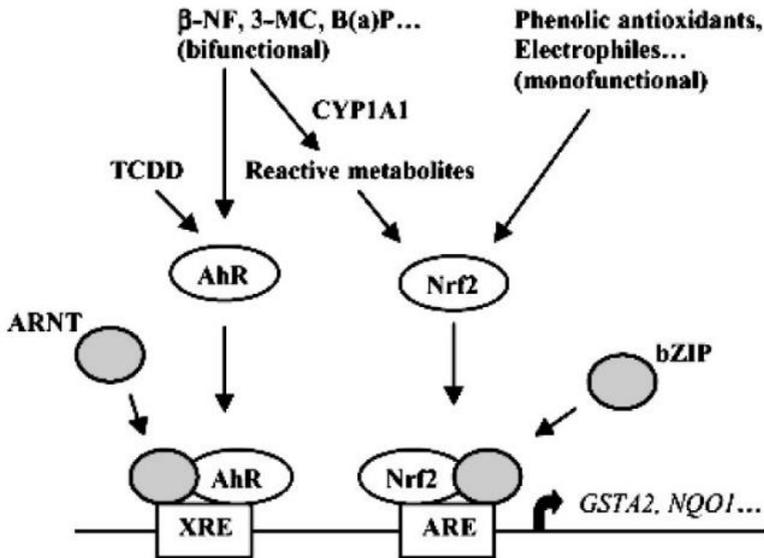


(Androutsopoulos dkk., 2009)

Gambar 6. Aktivasi metabolik DMBA menjadi senyawa metabolit karsinogen

## 2.7 Hormon Estrogen

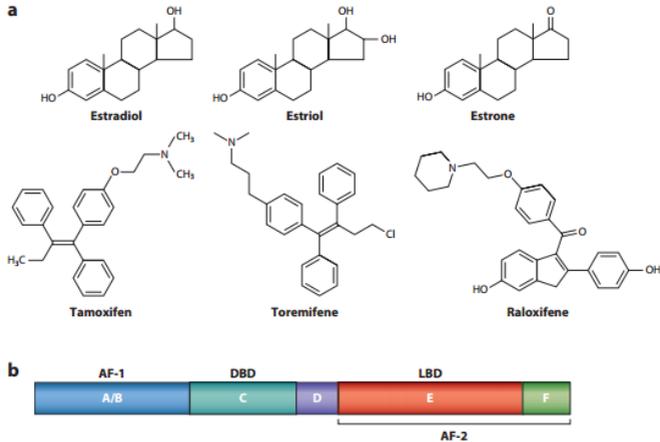
Hormon estrogen merupakan salah satu jenis hormon yang memiliki fungsi fisiologi yang luas mulai dari regulasi siklus menstruasi dan reproduksi terhadap modulasi kepadatan tulang, fungsi otak hingga mobilisasi kolesterol (Liang, J. & Shang, Y., 2013). Estrogen yang tinggi pada wanita yang terjadi secara abnormal dapat dikaitkan dengan peningkatan peristiwa terjadinya beberapa jenis kanker terutama kanker payudara dan endometrium (Prentice dan Anderson, 2008). Estrogen intraselular yang paling dominan adalah  $17\beta$ -estradiol (E2) dan jenis lainnya yaitu estron (E1) dan estriol (E3) (Gambar 8a). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa estrogen dapat berperan dalam perkembangan dan progresi dari beberapa jenis kanker seperti kanker payudara, endometrium, ovarium, prostat, paru-paru dan colon.



(Nguyen dkk, 2003)

Gambar 7. Mekanisme aktivasi ARE oleh NRF2 melalui adanya metabolit reaktif

Estrogen dapat menjalankan berbagai perannya pada jaringan target melalui ikatan dengan reseptor intraselular yang spesifik yang disebut reseptor estrogen (ER). Reseptor estrogen dibedakan menjadi dua yaitu ER $\alpha$  dan ER $\beta$ . (Jensen dkk., 2010.). ER $\alpha$  dan ER $\beta$  dikode oleh gen yang berlokasi di kromosom yang berbeda yaitu ESR1 dan ESR2. ER $\alpha$  dan ER $\beta$  banyak diekspresikan di jaringan seperti uterus, ovarium, kelenjar payudara, prostat, paru-paru dan otak. Tingkat ekspresi dan sub tipe dari ER merupakan faktor utama yang menentukan *tissue-specific estrogen responsiveness*. ER $\alpha$  dan ER $\beta$  tergolong dalam *the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-regulated transcription factors* yang berisi struktur modular dan memiliki domain fungsional sendiri (Gambar 8b). Perbedaan fungsi yang utama antara ER $\alpha$  dan ER $\beta$  terdapat pada *the hormone-independent transcriptional activation function (AF-1) domains* pada masing-masing *N termini* (Liang dan Shang, 2013).



(Liang, & Shang, 2013)

Gambar 8. Struktur kimia dan domain reseptor estrogen. Keterangan: (a) Struktur kimia estrogen dan beberapa modulator reseptor estrogen (b) *The functional domains* dari reseptor estrogen (ER)

Perubahan genetik dan efek onkogenik dari estrogen merupakan salah satu penyebab terjadinya kanker pada manusia. Aktivasi kompleks estrogen-ER meregulasi beberapa gen yang berperan dalam proses proliferasi sel dan siklus sel. Efek mitogenik dari estrogen terjadi pada fase transisi G1 ke S dengan efekornya yaitu *cMyc* dan *cyclin D1* (Caldon dkk., 2010; Musgrove dkk., 2011; Liang dan Shang, 2013). Estrogen menghambat apoptosis melalui proses peningkatan ekspresi antiapoptotik Bcl-2 dan Bcl-XL pada kanker payudara (Gompel dkk., 2000). Pertumbuhan yang cepat dan pembelahan sel pada sel tumor membutuhkan persediaan nutrisi yang cukup dari darah melalui proses angiogenesis. Angiogenesis terjadi melalui beberapa tahapan diantaranya degradasi membran basal pembuluh darah, proliferasi dan migrasi sel endotelial menjadi struktur tubular pada jaringan dan pembentukan matriks baru di sekitar pembuluh baru. Estrogen meningkatkan pembentukan pembuluh darah pada uterus selama siklus menstruasi. ES menstimulasi sekresi *interleukin 8* dan faktor pertumbuhan vaskular endotelial pada kanker payudara. (Liang & Shang, 2013).