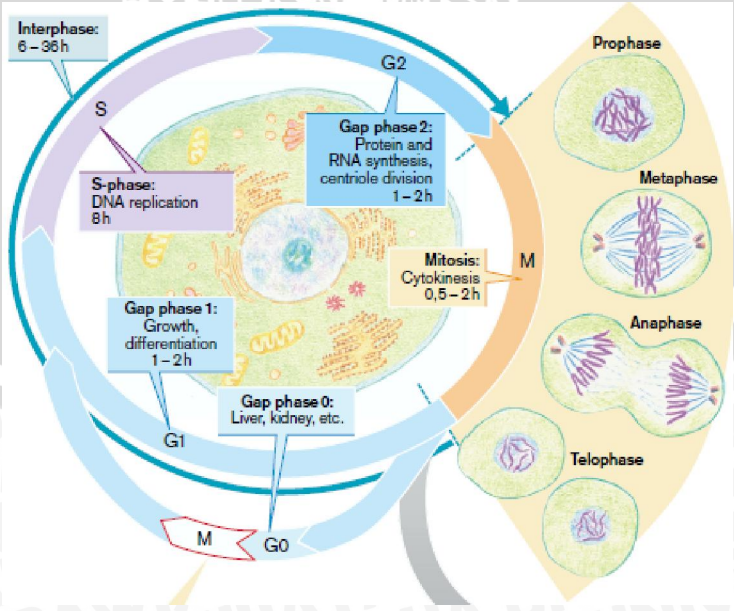
# BAB II

# KAJIAN PUSTAKA

## 2.1 Kanker

Kanker merupakan pertumbuhan sel-sel abnormal tidak terkontrol (sel neoplasma) yang merupakan hasil mutasi dari sel normal. Pertumbuhan sel neoplasma ini dapat mengganggu fungsi normal dari organ-organ vital dan dapat menyebar keseluruh tubuh (metastasis) (Wikinjosastro, 2007). Pertumbuhan sel abnormal tersebut cenderung menyerang jaringan disekitarnya dan menyebar ke organ tubuh lain yang letaknya jauh. Sel kanker tidak berenspon terhadap sinyal normal pengontrol reproduksi sel dan mengalami siklus sel lebih sering dibandingkan dengan sel normal. Sel kanker hanya menghabiskan sedikit waktu dalam stadium gap interfase dan sering dijumpai berada dalam stadium M (mitosis) dan S (replikasi DNA) (Corwin 2009, dalam Kusferdiana dkk, 2011).




**Gambar 2.1.** Siklus Sel (Kumar, 2013).

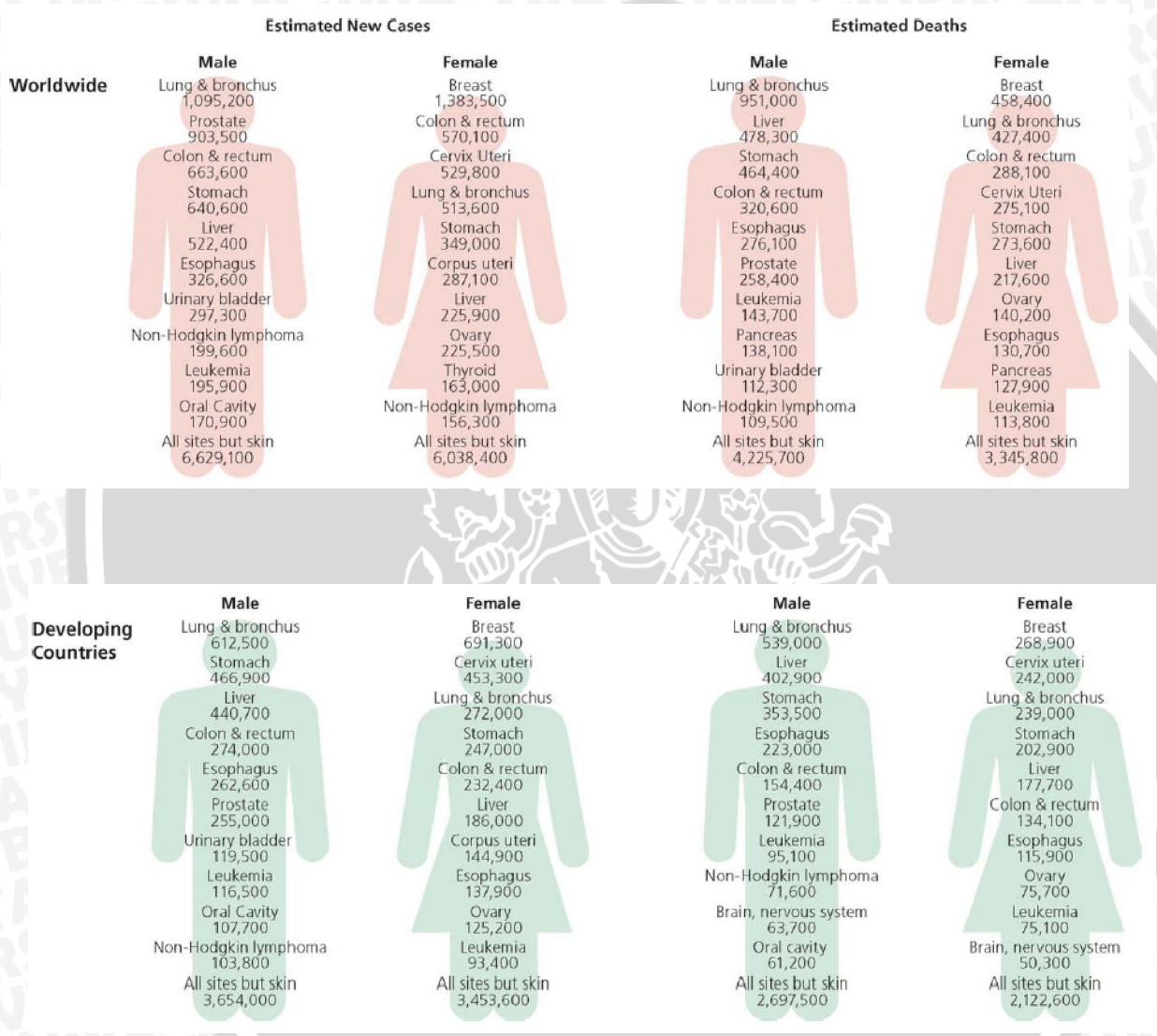
## 2.2 Kanker Serviks

Kanker serviks merupakan kanker primer yang terdapat pada serviks bagian ujung depan rahim yang menjulur ke vagina (Wikinjosastro, 2007). Kanker ini tumbuh dengan lambat dan mungkin tidak menunjukkan gejala akan tetapi dapat dideteksi dengan pemeriksaan awal (Cauley, 2012).

### 2.2.1 Epidemiologi

Didunia kanker serviks menempati urutan ketiga penyebab kejadian kanker pada wanita dan peringkat keempat pada statistika kematian karena kanker. Diperkirakan pada tahun 2008 terdapat 529.800 kasus kejadian kanker serviks dan 275.100 diantaranya meninggal dunia, kasus ini akan terus berkembang terutama dinegara berkembang (Cauley, 2012). Dinegara berkembang kanker serviks diperkirakan penyebab dari 80% kasus baru (Clifford *et al*, 2003). Hal ini sesuai dengan penelitian statistika perkembangan kanker oleh Jernal *et. al.* (2011) menyatakan bahwa dinegara berkembang baik kasus maupun kematian karena kanker serviks mencapai lebih dari 85%. Sementara itu, beberapa rumah sakit pendidikan di Indonesia melaporkan terdapat 3112 kasus kanker serviks dengan berbagai variasi stadium ditahun 2007. Asosiasi Patologi Anatomi Indonesia bekerjasama dengan Perhimpunan Kanker Indonesia mencatat 2532 kasus kanker serviks pada tahun 2002 (Aziz, 2009). Sekitar 65-86% kanker serviks invasif adalah tumor sel skuamosa, 10-25% adalah adenokarsinoma, <5% adalah adenoskuamosa dengan struktur epitel dan kelenjar, dan jarang pada subtipe sel lainnya (Cauley, 2012). Di negara-negara barat, proporsi adenokarsinoma lebih banyak dibandingkan jenis lainnya. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya program skrining sitologis rutin dinegara tersebut. Skrining sitologis lebih banyak mengambil sampel ektoserviks

dibanding endoserviks menyebabkan banyak berkurangnya kasus kanker sel skuamous, dan meningkatkan proporsi kanker sel kelenjar (Martin, 2007 dalam Kusferdiana dkk, 2011).




**Gambar 2.2.1.** Estimasi perkembangan kasus dan kematian kanker didunia (Jernal *et. al.*, 2011).

### 2.2.2 Etiologi

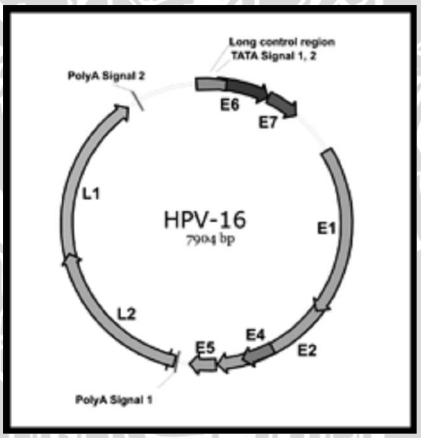
Studi epidemologi secara jelas menetapkan bahwa infeksi *Human papilloma virus* (HPV) merupakan penyebab utama pada kanker serviks. Berdasarkan penelitian International Agency for Research on Cancer (IARC) pada 22 negara, 99,7% kanker serviks disebabkan oleh HPV (Clifford et al, 2003). Lebih dari 80 tipe HPV diketahui, tetapi hanya 40 tipe diantaranya yang dapat menginfeksi saluran genital. Dari 40 tipe tersebut, HPV diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok faktor resiko rendah dan faktor resiko tinggi. Tetapi hanya 11 tipe HPV dengan faktor resiko tinggi yang dapat menginvasi kejadian kanker serviks, meliputi HPV tipe (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, dan 58) (Munoz, 2003). Prevalensi tipe HPV yang paling sering muncul ada pada tipe 6, 11, 16, dan 18 (Clifford *et. al*., 2003). Namun demikian, hanya HPV tipe 16 dan 18 yang paling sering menyebabkan terjadinya kanker serviks. Diperkirakan lebih dari 70% penyebab kanker serviks didunia berhubungan dengan infeksi HPV tipe 16 dan 18 (Cauley, 2012). Paparan radiasi atau pencemaran bahan kimia jangka lama juga dapat menyebabkan kanker serviks. Penelitian Karolinska Institute di Swedia yang dipublikasikan di British Journal of Cancer 2001 menyatakan hubungan kebiasaan merokok, diet, kehamilan, dan pemakaian kontrasepsi oral terhadap peningkatan risiko kanker serviks (Dillner, 2001).

### 2.2.3 Patogenesis

Rusmana (2009) mendefinisikan HPV sebagai bagian dari Famili *Papovaviridae*. *Papillomavirus* merupakan virus berukuran kecil berdiameter 45-55 nm, memiliki genom sirkular *double stranded DNA* dengan kapsid *icosahedral*

dan tidak berenvelop. Virus ini mempunyai tropisme pada sel epitel kulit dan membran mukosa.

Genom HPV terdiri atas bagian Late (*L*), early (*E*), dan bagian non koding (*NC*). Bagian *L* terbagi menjadi dua bagian, yaitu 95% *L*1 mayor (mengkode protein kapsid mayor) dan 5% *L*2 minor (mengkode protein kapsid minor). Bagian *E* merupakan 45% dari genom, terdiri atas *E*1-*E*8. *E6* berperan sebagai onkogen, menstimulasi pertumbuhan dan transformasi sel hospes dengan menghambat p53, protein onkosupresor. *E7* berperan sebagai onkogen, menginduksi proliferasi sel dengan menghambat protein pRb, p107 dan p130 (Rusmana, 2009).




**Gambar 2.2.3.** Organisasi genom HPV tipe 16 (Rusmana, 2009).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses onkogenesis HPV adalah faktor virus, antara lain tipe virus (kemampuan integrasi, kemampuan ekspresi onkogen, dan lain-lain) faktor hospes (respons imun humoral dan seluler, multiparitas, faktor genetik seperti HLA, p53) dan faktor lingkungan (merokok, kontrasepsi hormonal, penyakit hubungan seksual misal virus Herpes, dan faktor nutrisi) (Rusmana, 2009).

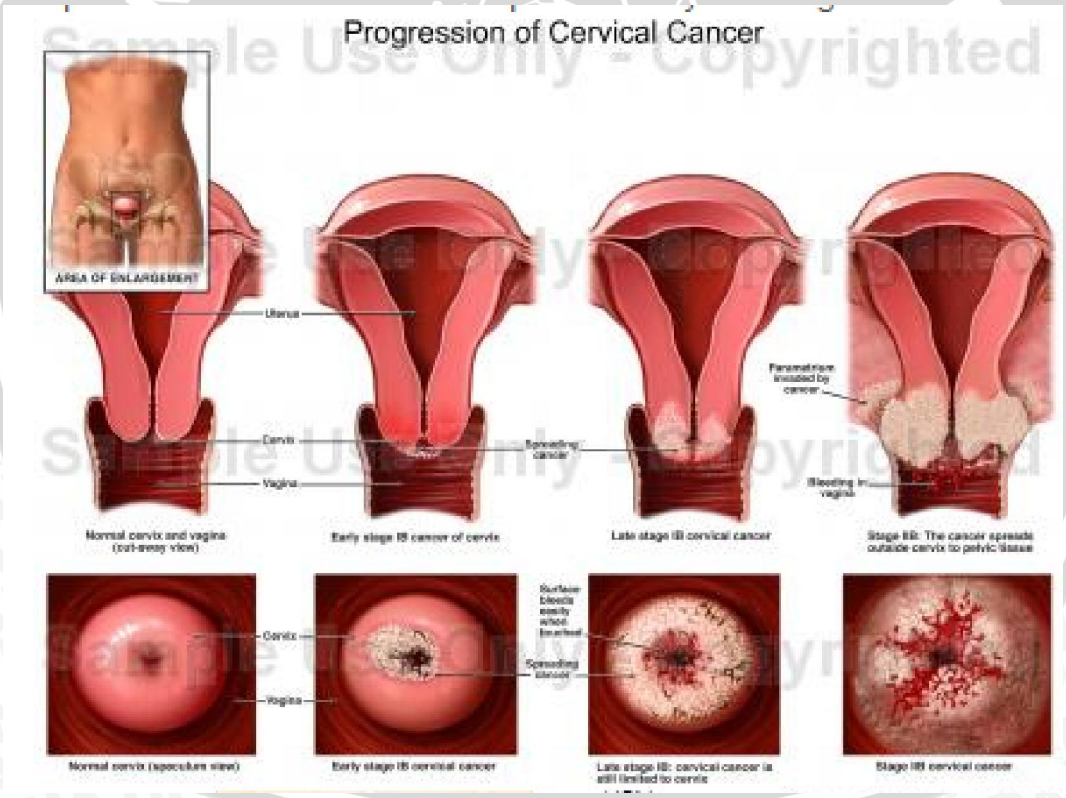
Onkoprotein E6 dan E7 merupakan penyebab terjadinya degenerasi keganasan. Onkoprotein E6 berinteraksi dan menginaktivasi protein p53 (*tumor supressor gene* yang bekerja sebagai penghenti siklus sel pada fase G1 melalui hambatannya pada kompleks *cdk-cyclin*). Akibatnya penghentian sel pada fase G1 tidak terjadi, dan perbaikan DNA tidak terjadi dan sel akan terus masuk ke fase S tanpa ada perbaikan. Sel abnormal ini akan terus berproliferasi tanpa kontrol. Selain itu juga menyebabkan apoptosis tidak berjalan. Pada karsinoma serviks didapatkan penurunan aktivitas Bcl-2, Bax, caspase 3 dan caspase 6 (Rusmana, 2009).

Onkoprotein E7 menghambat proses perbaikan sel melalui mekanisme berbeda. Pada proses regulasi siklus sel di fase G0 dan G1, pRb berikatan dengan E2F (protein yang merangsang siklus sel) akibat masuknya E7, menyebabkannya tidak aktif. Ikatan ini menyebabkan E2F bebas dan merangsang proto-onkogen *c-myc* dan *N-myc* yang selanjutnya terjadi proses transkripsi sehingga siklus sel berjalan. Integrasi DNA virus dengan genom sel tubuh merupakan awal dari proses ke transformasi. Integrasi DNA virus dimulai dari E1-E2, menyebabkan E2 tidak berfungsi sehingga menyebabkan overekspresi E6 dan E7. Hal tersebut menyebabkan siklus sel tidak terkontrol, perbaikan DNA dan apoptosis tidak terjadi (Rusmana, 2009).

### 2.2.4 Riwayat Perjalanan Penyakit

Infeksi HPV umumnya terjadi setelah wanita melakukan hubungan seksual dan umumnya terjadi pada usia sekitar 25 tahun. Selama hidupnya, hampir seluruh wanita dan laki-laki pernah terkena infeksi HPV dan 80 persen dari wanita terkena infeksi sebelum umur 50 tahun. Sebagian infeksi HPV

bersifat hilang timbul sehingga tidak terdeteksi dalam kurun waktu 2 tahun setelah infeksi. Hanya sebagian kecil saja dari infeksi tersebut menetap dalam jangka lama sehingga menimbulkan kerusakan lapisan lendir menjadi prekanker. HPV tipe 16 mendominasi infeksi (50-60%) pada penderita kanker serviks disusul dengan tipe 18 (10-15%). Dari infeksi HPV sampai dengan terjadinya kanker memerlukan waktu yang cukup lama, yaitu hampir 20 tahun. Pada periode tersebut didominasi waktu dari terjadinya CIN sampai dengan benar-benar terjadi keganasan pada leher rahim (Wilopo, 2010 dalam dalam Kusferdiana dkk, 2011).




**Gambar 2.2.4.** Perkembangan Kanker Serviks (*Revolution health*, 2008).

Telah diketahui bahwa infeksi HPV dapat menyebabkan kanker serviks dan menjadi precursor cepat *Cervical Intraepithelial Neoplasia* (CIN) 3 (CIN 3). Meskipun demikian, infeksi HPV saja tidak cukup untuk menyebabkan kanker serviks, diperlukan faktor lain meliputi faktor endogen dan faktor eksogen, berkonjugasi dengan HPV, mempengaruhi resiko progesi infeksi HPV menjadi kanker serviks. Kandidat kofaktor tersebut dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu (Costellsague dan Munos, 2003 dalam Kusferdiana dkk, 2011) :

- Lingkungan / faktor eksogen, termasuk didalamnya penggunaan kontrasepsi oral, merokok, makanan, trauma serviks, koinfeksi HIV, dan agen menular lainnya.
- Kofaktor virus, seperti infeksi tipe spesifik, koinfeksi dengan tipe yang lain, varian HPV, jumlah virus, integrasi virus.
- Kofaktor host, termasuk hormon endogen, faktor genetik dan faktor lain yang berhubungan dengan respon imun host.

**2.2.5 Faktor Risiko**

Dinyatakan oleh (Cauley, 2012) terdapat delapan macam faktor yang dapat meningkatkan risiko kejadian kanker serviks meliputi :

- HPV tipe 16 fan tipe 18.
- Melakukan hubungan seksual pada usia dini.
- Merokok, nikotin merupakan salah satu metabolit pada rokok yang dapat ditransmisi dari pembuluh darah menuju serviks, pada beberapa penderita kanker serviks ditemukan adanya nikotin pada mukus serviks
- Berganti-ganti pasangan saat melakukan hubungan seksual.
- Terdapat riwayat penyakit seksual.
- Riwayat penyakit kronis pada sistem imun (HIV, transplantasi).

- Status sosial ekonomi rendah, sehingga keterbatasan akses kesehatan.

### 2.2.6 Tanda dan Gejala

Pada awal perkembangan kanker serviks sering kali asimtomatik, walaupun mungkin pasien mengalami *vaginal discharge* (keluarnya cairan abnormal dari vagina) dan pendarahan setelah koitus. Berkembangnya penyakit menampakkan pendarahan vagina yang tidak normal, keputihan berlebihan dan tidak normal, perdarahan di luar menstruasi, penurunan berat badan drastis, nyeri punggung (bila sudah menyebar ke panggul), hambatan berkemih, dan pembesaran ginjal (Cauley, 2012). Penyebaran jauh hematogen dan limfogen terutama ke paru-paru, kelenjar getah bening mediastenum dan supraklavikula, tulang dan hati. Penyebaran ke paru-paru menimbulkan gejala batuk, batuk darah, dan kadang-kadang nyeri dada. Kadang disertai pembesaran kelenjar getah bening supraklavikula terutama sebelah kiri (Sudirman, 2010 dalam Kanayasan, 2010).

### 2.2.7 Stadium Kanker Serviks

Tingkat keganasan klinik kanker serviks menurut klasifikasi Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO) tahun 2000 dibagi menjadi 4 stadium berdasarkan ukuran tumor, kedalaman penetrasi, dan penyebaran kanker di dalam maupun luar serviks (Muttaqin, 2010).

**Tabel 2.2.7.** Stadium Kanker Serviks (Muttaqin, 2010).

| Tingkat | Keterangan |
|---|---|
| 0 | Karsinoma insitu (*preinvasive carcinoma*). |
| 1 | Karsinoma terbatas pada serviks. |
| 1A | Karsinoma hanya bisa didiagnosis secara |

| | |
|---|---|
| | mikroskopis . |
| **1A1** | Invasi stroma dalamnya 3 mm dan lebarnya < 7 mm. |
| **1A2** | Invasi stroma dalamnya 3-5 mm dan lebarnya > 7 mm. |
| **1B** | Secara klinis tumor dapat diidentifikasi pada serviks atau massa tumor lebih besar dari 1A2. |
| **1B1** | Secara klinis lesi ukuran < 4 cm. |
| **1B2** | Secara klinis lesi ukuran > 4 cm. |
| **II** | Tumor telah menginvasi uterus tapi tidak mencapai 1/3 distal vagina atau dinding panggul. |
| **IIA** | Tanpa invasi ke parametrium. |
| **IIB** | Dengan invasi ke parametrium. |
| **III** | Tumor menginvasi sampai dinding pelvis dan atau menginfiltrasi sampai 1/3 distal vagina, dan atau menyebabkan hidronefrosis atau gagal ginjal. |
| **IIIA** | Tumor hanya menginfiltrasi 1/3 distal vagina. |
| **IIIB** | Tumor sudah menginfiltrasi dinding panggul. |
| **IVA** | Tumor menginvasi mukosa kandung kemih atau rectum dan atau menginvasi keluar dari pelvis. |
| **IVB** | Metastasis jauh. |

### 2.2.8 Pengobatan

Pada wanita, kanker serviks dapat dicegah dengan mengikuti program skrining sitologi tes Pap smear, tes HPV DNA, dan tes molekular. Sementara itu telah berkembang vaksin HPV, namun tidak semua negara dapat menggunakan vaksin HPV karena persediaannya terbatas dan mahal (Goldie *et. al.*, 2005). Standar pengobatan pasien dengan tahap mikroinvasif adalah histerektomi sederhana. Pendekatan konservatitif dengan observasi setelah biopsi yang

adekuat terkadang dipertimbangkan pada pasien pada tahap mikroinvasif yang ditujukan untuk melindungi fertilitas pasien. Pasien dengan IB atau IIA diobati dengan pembedahan atau radioterapi karena kedua pendekatan ini memiliki kesamaan manfaat bagi kelangsungan hidup. Mulai dari stadium IVB mulai diberikan kemoterapi (Cannistra dan Niloff, 1996 dalam Kusferdiana dkk, 2011).

**2.3 Sel HeLa**

Sel HeLa merupakan sel line immortal yang digunakan untuk penelitian di bidang kedokteran yang semuanya diturunkan dari sel kanker serviks dari Henrietta Lacks, pasien yang meninggal karena kanker serviks pada 4 Oktober 1951. Sel HeLa berproliferasi secara cepat dibandingkan dengan sel kanker yang lain. Sel HeLa yang tumbuh dalam suspensi memiliki *doubling time* 23 jam (Percell Biolytica) (Fountoulakis *et. al.*, 2004).

**Tabel 2.3.** Klasifikasi sel HeLa (Fountoulakis *et. al.*, 2004).

| **Kingdom** | ***Incertae sedis*** |
|---|---|
| **Phylum** | *Incertae sedis* |
| **Class** | *Incertae sedis* |
| **Order** | *Incertae sedis* |
| **Family** | *HeLacytidae* |
| **Genus** | *HeLacyton* |
| **Species** | *HeLacyton gartleri* |

### 2.3.1 Sel HeLa CCL-2

Sel HeLa CCL-2 merupakan sel HeLa yang diproduksi oleh American Type Culture Collection (ATCC) yang terinfeksi HPV tipe 16 dan HPV tipe 18 (ATCC, 2013).

**Tabel 2.3.1.** Sel HeLa CCL-2 (ATCC, 2013).

| | |
|---|---|
| **Organisme** | *Homo sapiens,* manusia |
| **Jaringa** | Serviks |
| **Jenis Penyakit** | Adenokarsinoma |
| **Tipe Sel** | Epitel |
| **Usia** | 31 tahun |
| **Gender** | Perempuan |
| **Morfologi** | Epitel |
| **Marker HeLa** | Y |
| **Pertumbuhan** | Menyesuaikan |
| **Pengujian Virus** | ATCC mengkonfirmasi bahwa pada sel line ini positif mempresentasikan HPV menggunakan sequens DNA HPV melalui PCR. |
| **HPV** | 16 dan 18 |

### 2.4 Salam (Eugenia polyantha)

*Taksonomi*

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom : *Tracheobionta*

Divisio : *Spermatophyta*

**Gambar 2.4.** *Eugenia Polyantha* (Muafidah, 2008).

Subdivisio : *Pinophyta*

Kelas : *Coniferopsida*

Famili : *Eugenia*

Genus : *Myricales*

Spesies : *Eugenia polyanthum* (Wight) walp

Sinonim : *Eugenia lucidula miq* dan

*Syzyqium polyanthum Wight*

(Sumono dan Wulan, 2008).

Nama Daerah : salam (Madura), salam, ubar serai (Melayu), salam, manting (Jawa), salam, gowok (Sunda), Kastolam (Kangean)

Nama Asing : *salam leaf* , *bay leaf* (inggris) (Hariana, 2006).

Tanaman ini merupakan tanaman asli Asia Tenggara, ditemukan di Burma, Malaysia dan Indonesia (Wartini dkk, 2007). Beberapa spesies termasuk family *Eugenia* dan genus *Myrtaceae* seperti *Eugenenia jambolana* telah digunakan secara luas pada berbagai *ethnomedicine* sebagai antidiabetes, antidiare, antinematodes, dan anti-inflamasi. Diantara mereka contohnya *Eugenia polyantha Wight*, daun *Eugenia polyantha Wight* di Indonesia digunakan sebagai bahan tambahan tanaman, selain itu digunakan sebagai pengobatan antiulcer, antidiabetes, antiinflamasi, dan antidiare karena potensi antioksidannya (Lelono *et all*, 2009). Moi (2005) menyebutkan salam termasuk salah satu dari 5 tanaman yang mempunyai aktivitas antitumor yang tinggi. Secara oral manusia dewasa di Indonesia (berat badan 50 kg) mengkonsumsi daun salam untuk pengobatan tradisional sebanyak 7 gram (Studiawan dan Santosa, 2005). Perbanyakan salam dapat menggunakan biji atau stump, dan tempat yang cukup matahari (Permadi, 2008).

Perumal (2012) mengemukakan kandungan kimia dari daun salam (*Eugenia polyantha)* yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi adalah fenol dan beta karoten. Selain itu Har (2012) menunjukkan keberadaan asam galat dan asam kafeat sebagai komponen mayor asam fenolik pada ekstrak metanol daun salam. Ektrak etanol 96% daun daun salam memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai $IC_{50}$ adalah 26,401 µg/mL (Hayati, 2011). Wong (2005) menyatakan bahwa ekstrak daun salam merupakan salah satu tanaman yang memiliki antioksidan yang tinggi dan juga memiliki TPC yang tinggi.

Beberapa studi sebelumnya menunjukkan beberapa aktivitas biologi dari asam galat meliputi antitumor, antioksidan, dan antiinflamasi. Asam galat dan derivatnya menunjukkan aktivitas antikanker pada beberapa tipe tumor sel secara invitro. Aktivitas tumor berhubungan dengan meningkatnya induksi apoptosis pada berbagai jalur. Asam galat dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan ROS dan disfungsi mitokondria. Menariknya, asam galat dapat menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan dan prooksidan. Level ROS intraseluler meningkat pada kanker yang dipapar dengan asam galat dan derivatnya, sehingga asam galat memainkan peranan penting sebagai prooksidan pada sel model kanker. Beberapa studi melaporkan asam galat menyebabkan apoptosis pada beberapa sel kanker melalui deplesi GSH. GSH intraseluler menentukan efek obat yang menginduksi apoptosis pada sel kanker. Asam galat dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan aktivitas caspase 3, caspase 8, mengubah rasio Bcl-2/Bax, dan menghambat fosforilasi tirosin. Asam galat dapat menginduksi apoptosis melalui berbagai macam mekanisme dan merupakan kandidat antikanker yang baik pada studi klinis (Locatelli *et. al.*, 2013). Sementara berdasarkan penelitian Watabe *et al* (2004) asam kafeat dapat

meningkatkan aktivasi caspase dan ekspresi Bax melalui hambatan NF-κB dan aktivasi Fas.

**2.5 Sirih Merah (*Piper crocatum*)**

*Taksonomi*

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Mognoliopsida

Subkelas : Magnoliidae

Bangsa : Piperales

Suku : Piperaceae

Genus : P*iper*

Spesies : *Piper crocatum* (Alfarabi, 2010).

**Gambar 2.5.** *Piper crocatum* (Alfarabi, 2010).

Hadi (2012) dari ekstrak methanol daun sirih merah didapatkan 3 komponen utama yaitu asam oktadekanoat,2,3-bis(hidroksi)propil ester-β-asetil maltosida, Hidoksikavikol-β-Maltosida, dan kavibetol asetat-β-asetil maltosida. Alfarabi (2010) mengemukakan Komponen senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol 70% daun daun sirih merah adalah golongan asam lemak, terpenoid, flavonoid, steroid , alkaloid, pirimidin , minyak atsiri, polifenol, dan vitamin E. Ekstrak metanol daun sirih merah memiliki aktivitas penghambatan sel yang di teliti pada kanker payudara. Daun sirih merah secara tradisional di Indonesia digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya kanker payudara (Wicaksono *et.al.*, 2009). Ekstrak etanol 96% daun sirih merah memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai $IC_{50}$ sebesar 38,393 µg/mL (Hayati, 2011).

Secara tradisional untuk pengobatan tumor payudara digunakan 1 lembar daun sirih merah dengan 1 gelas air dan direbus (Hidayat, 2009).

**2.6 Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Salam dan Sirih Merah**

Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Sekti, Sari, dan Wicaksono (2014) membandingkan perbedaan ekstrak daun salam dan sirih merah baik secara kuantitatif dan kualitatif dapat dilihat dalam tabel berikut :

**Tabel 2.6.1**. Uji Kualitatif Komponen Fitokimia Ekstrak Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Sekti, 2014; Wicaksono, 2014).

| Tipe Tes | Daun Salam | | Daun Sirih Merah | |
|---|---|---|---|---|
| | maserasi | soklet | maserasi | soklet |
| Alkaloid | + | + | + | + |
| Flavonoid | + | + | + | + |
| Tannin | + | + | + | + |
| Saponin | + | + | + | + |
| Terpenoid | + | + | + | + |
| Fenol | + | + | + | + |

**Tabel 2.6.2** Kandungan Fenol Total Ekstrak Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Sari, 2014).

| Sampel Ekstrak | Metode Ekstraksi | Total Fenol Total (GAE/gram ekstrak) |
|---|---|---|
| Salam | Maserasi | 47,706 mg |
| | Soklet | 62,465 mg |
| Sirih Merah | Maserasi | 48,775 mg |
| | Soklet | 96,470 mg |

**Tabel 2.6.3** Total Flavonoid Ekstrak Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Sari, 2014).

| Sampel Ekstrak | Metode Ekstraksi | Total Favonoid Total |
|---|---|---|
| Salam | Maserasi | 4,615% |
| | Soklet | 2,885% |
| Sirih Merah | Maserasi | 6,07% |
| | Soklet | 5,205% |

**2.7 Caspase 3**

Apoptosis atau kematian sel terprogram sangat penting dalam mengontrol jumlah sel dan proliferasi (Ghobial *et. al.*, 2005). Dalam mempelajari apoptosis terdapat 4 gen pengontrol, meliputi ced-3 (caspase *family*), ced-4 (Apaf-1), ced-9 (Bcl-2), dan egl-1 (BH3-). Caspase (*cysteine-dependent as partate-spesific protease*) dikenal sebagai penentu terjadinya program apoptosis terbesar. Caspase merupakan homolog dari gen ced-3. Terdapat 14 jenis caspase, 11 diantaranya terdapat pada manusia. Caspase secara langsung maupun tidak langsung menyebabkan perubahan morfologi sel selama apoptosis. Caspase merupakan preskusor laten, apabila caspase teraktivasi maka program kematian sel dimulai dengan penghancuran komponen kunci dari infrastuktur seluler serta pengaktifan faktor-faktor yang memediasi kerusakan sel. Procaspase terdiri dari p10 dan p20 subunit dengan domain N-terminal. Caspase dikatergorikan menjadi 2 kelompok, *upstream initiators* dan *downstream executioners*. *Upstream caspases* dapat diaktifkan oleh sinyal kematian sel (misalnya TNF-α), kemudian *Upstream caspases* akan mengaktifkan *downstream caspases* yang secara langsung megaktivasi kematian sel. Caspase 2, 8, 9, dan 10 merupakan caspase inisiator, sementara caspase 3, 6, dan 7 merupakan caspase efektor. Selain apoptosis, caspase juga mengatur regulasi level transkripsi (Friedlander, 2003).

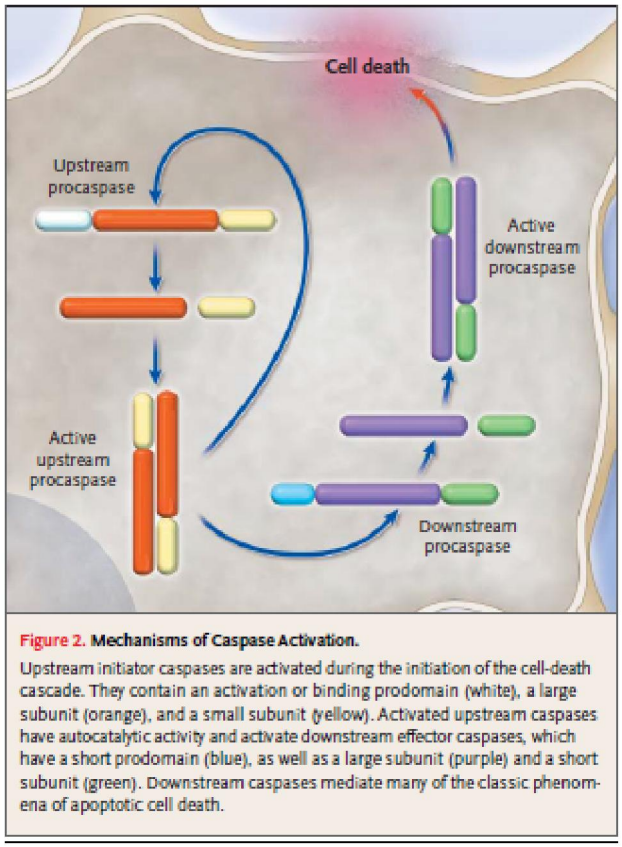
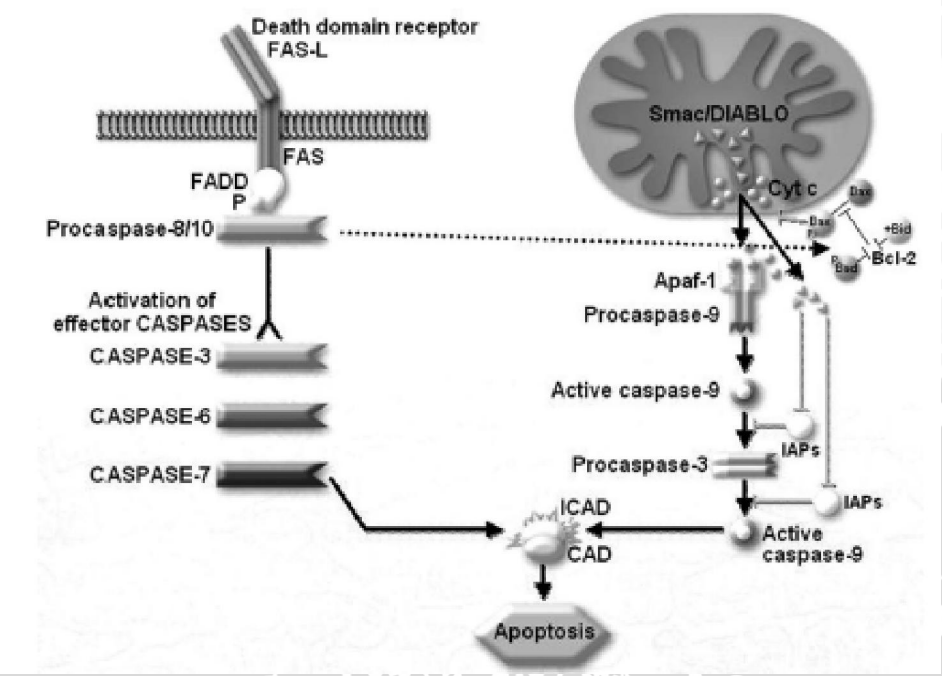



Figure 2. **Mechanisms of Caspase Activation.**
Upstream initiator caspases are activated during the initiation of the cell-death cascade. They contain an activation or binding prodomain (white), a large subunit (orange), and a small subunit (yellow). Activated upstream caspases have autocatalytic activity and activate downstream effector caspases, which have a short prodomain (blue), as well as a large subunit (purple) and a short subunit (green). Downstream caspases mediate many of the classic phenomena of apoptotic cell death.

**Gambar 2.7.1.** Mekanisme Aktivasi Caspase (Friedlander, 2003).

Sementara itu (Ghobial *et. al.*, 2005) menyatakan caspase merupakan jalur terakhir pada berbagai sinyal apoptosis. Tidak semua caspase menyebabkan apoptosis, hanya caspase -3, -6, -7, -8 dan -9 yang berhubungan dengan apoptosis. Apoptosis ekstrinsik dan intrinsik akan berakhir pada caspase 3. Caspase 9 mengaktivasi caspase 3 disebut dengan apoptosis intrinsik atau apoptosis mitokondria, sedangkan caspase 8 mengaktivasi caspase 3 disebut dengan apoptosis ekstrinsik. Teraktivasinya caspase menginduksi pecahnya protein kinase, sitiskeletal protein, protein yang memperbaiki DNA, dan akhirnya merusak fungsi sel. Caspase juga mempengaruhi stuktur sitoskeletal, regulasi siklus sel, dan jalur signaling. Manifestasi dari apoptosis seperti kondensasi dan fragmentasi DNA, *membrane blebbing*, dan pengerutan sel.




**Gambar 2.7.2.** Mekanisme Apoptosis (Ghobial *et al*, 2005).

## 2.8 *Reactive Oxygen Species* (ROS)

### 2.8.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tak berpasangan di lapisan luarnya. Reaksi jangka pendek dengan satu atau lebih elektron bebas, partikel kecil berenergi tinggi. Dapat digunakan untuk menghasilkan tenaga dan beberapa fungsi fisiologis seperti kemampuan untuk membunuh virus dan bakteri. Namun karena memiliki tenaga yang sangat tinggi, zat ini juga dapat merusak jaringan normal apabila jumlahnya terlalu banyak. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada membran sel, mempengaruhi pembuluh darah, dan produksi prostaglandin (Droge, 2002 dan Proctor, 1984 dalam Arief, 2003).

### 2.8.2 Sumber dan Macam Radikal Bebas

Radikal bebas terpenting di tubuh adalah derivat oksigen yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS), termasuk triplet ($3O_2$), tunggal (singlet/$1O_2$), anion superoksida ($O_2^-$), radikal hidroksil ($^-OH$), nitrit oksida ($NO^-$), peroksinitrit ($ONOO^-$), asam hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida ($H_2O_2$), radikal alkoksil ($LO^-$), dan radikal peroksil ($LO_2^-$). Radikal bebas mengandung karbon ($CCL_3^-$) berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal mengandung hidrogen hasil penyerangan atom H ($H^-$). Bentuk lain adalah radikal mengandung sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutation menghasilkan radikal *thiyl* ($R^-S^-$). Sumber radikal bebas adalah endogen (autooksidasi dan oksidasi enzimatik) dan eksogen (obat-obatan, radiasi, dan asap rokok). Definisi stres oksidatif adalah suatu keadaan di mana tingkat *Oxigen Reaktive Intermediate* (ROI) toksik melebihi pertahanan anti-oksidan endogen, mengakibatkan kelebihan radikal bebas yang bereaksi dengan lemak, protein, asam lemak seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ. Lemak merupakan biomolekuler yang rentan serangan tersebut (Arief, 2003).

### 2.8.3 Mekanisme Pengrusakan Sel dengan Perantara ROS

Arief (2003), membran sel kaya *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA), yang mudah dirusak bahan-bahan pengoksidasi dalam peroksidasi lemak. Pemecahan hidrogen peroksida lemak sering melibatkan katalisis ion logam transisi. Radikal bebas juga menginduksi kerusakan DNA, menjadi suatu reaksi berantai, biasanya terjadi bila ada lesi pada susunan molekul. Apabila tidak dapat diatasi dan terjadi sebelum replikasi, maka akan terjadi mutasi. Radikal oksigen menyerang DNA jika terbentuk di sekitar DNA seperti pada radiasi

biologis. Radikal bebas juga menyebabkan kerusakan protein. Protein dan asam nukleat lebih tahan terhadap radikal bebas daripada PUFA, sehingga kecil kemungkinan reaksi berantai cepat. Serangan radikal bebas terhadap protein sangat jarang kecuali bila sangat ekstensif. Hal ini terjadi hanya jika radikal tersebut mampu berakumulasi (jarang pada sel normal), atau bila kerusakan terfokus di daerah tertentu protein. Salah satu penyebab kerusakan terfokus adalah jika protein berikatan dengan ion logam transisi (Arief, 2003).

Bandyopadhyay *et. al.* (1999) menyatakan, mekanisme pengrusakan oksidatif protein oleh ROS telah dipelajari secara *in vitro* dengan membiakkan spesies reaktif ini pada larutan ataupun 'titik khusus' dalam protein. Kerusakan di awal disebut kerusakan tidak spesifik (global), sementara di akhir disebut kerusakan terlokalisasi. Kerusakan tidak spesifik dapat disimulasikan dengan membiakkan ROS teraktivasi *in situ* menggunakan sumber radiasi $^{60}Co$ atau teknik pulsa radiolisis yang menuntun ke agregasi, fragmentasi protein, dan modifikasi hampir semua residu asam amino. Kerusakan terlokalisasi yang dipelajari secara ekstensif menggunakan enzim glutamin sintetase, dapat terjadi ketika ROS, misalnya $^{\cdot}OH$, terbentuk di titik protein yang diduga sebagai tempat ikatan logam (*metal-binding site*). Saat titik ini ditempati oleh besi atau tembaga, mereka dapat bereaksi dengan $H_2O_2$ untuk membentuk $^{\cdot}OH$ yang sangat reaktif yang bisa bereaksi terutama dengan asam amino spesifik di sekitar *metal-binding site*, menginduksi kerusakan spesifik dengan manifes tidak terdapat modifikasi struktural besar.

Sifat reaktif yang tersebar dari sistem pembentukan radikal dalam sel menyebabkan evolusi mekanisme pertahanan terhadap efek perusakan suatu bahan teroksidasi kuat. SOD (superoksida dismutase dan katalase) mengkata-

lisasi dismutasi dari superoksida dan hidrogen peroksida. GSH (glutation) peroksidase mereduksi hidrogen peroksida dan organik menjadi air dan alkohol. GSH *S-transferase* melakukan pemindahan residu glutation menjadi metabolit elektrofilik reaktif (Arief, 2003).

### 2.8.4 Perubahan Level ROS Intrinsik dalam Karsinogenesis

Radikal bebas diketahui sebagai penyebab mayor penyakit degeneratif kronik (penuaan, PJK, inflamasi, stroke, diabetes mellitus, dan kanker) (Mohamed *et. al.,* 2008). ROS menstimulasi proliferasi sel dan menginduksi instabilitas genetik, peningkatan di kanker ditampakkan sebagai *adverse event*. Trachootham *et. al.* (2006), kebanyakan sel kanker berada di tekanan oksidatif seiring peningkatan aktivitas metabolisme dan produksi ROS. Peningkatan ROS berperan penting dalam mempertahankan fenotip kanker berkaitan efek stimulatifnya terhadap pertumbuhan dan proliferasi sel dan ketidakstabilan genetik.

Tekanan persisten di level subletal menyebabkan resistensi apoptosis, memungkinkan proliferasi sel, promosi mutasi, ketidakstabilan genetik, perubahan sensitivitas seluler terhadap agen antikanker, invasi, dan metastasis. Radikal oksigen juga meningkatkan produksi faktor angiogenik IL-8 dan VEGF oleh sel tumor serta sekresi MMP-1 (kolagenase yang membantu pertumbuhan pembuluh darah dalam microenvironment (Sharma *et. al.*, 2010).

### 2.8.5 Perubahan Level Antioksidan Intrinsik dalam Karsinogenesis

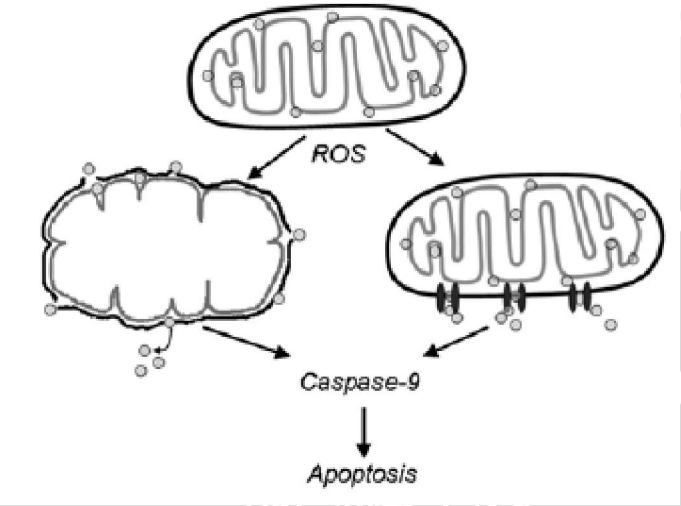
Antioksidan terdiri atas enzimatik dan non-enzimatik: superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutation (GSH), glutation peroksidase (GPx),

glutation reduktase (GR), asam askorbbat (vitamin C), dan alfa tokoferol (vitamin E). Di bawah tekanan oksidatif, antioksidan seluler terdeplesi. Antioksidan primer (SOD, CAT, dan GPx) mengeliminasi langsung ROS, sementara antioksidan sekunder (GST dan GR) membantu detoksifikasi ROS dengan mengurangi level peroksida (oleh GST) atau mempertahankan suplai intermediate metabolik (oleh GR) untuk antioksidan primer. Antioksidan menghambat inisiasi dan promosi pada karsinogenesis dan menetralkan imortalisasi dan transformasi sel. Ada dua teori tentang penurunan level antioksidan, yang pertama hal itu terjadi karena antioksidan digunakan untuk melawan peroksidasi lemak, yang kedua hal itu mengakibatkan naiknya peroksidasi lemak (Sharma *et. al.,* 2010).

### 2.8.6 Mekanisme Apoptosis Kanker melalui ROS

Penelitian Trachootham *et. al.* (2006) adalah terapi kanker berbasis usaha peningkatan level ROS menggunakan *b-phenylethyl isothiocyanate* (PEITC). Senyawa ini menginduksi akumulasi ROS melalui dua mekanisme (1) deplesi GSH melalui promoting eksportasinya dan (2) menghambat aktivitas enzim GPX, yang bersamaan menghentikan sistem antioksidan GSH. Transformasi onkogenik sel apitel ovarium dengan *H-Ras*$^{V12}$ atau ekspresi *Bcr-Abl* pada sel hematopoietik menyebabkan peningkatan generasi ROS membuat sel ganas menjadi sangat sensitif terhadap PEITC, yang secara efektif menonaktifkan sistem antioksidan glutation dan menyebabkan akumulasi ROS yang membahayakan terutama pada sel tertransformasi akibat output ROS aktif. Sementara itu (Szeto, 2005) menyatakan, peningkatan ROS memainkan peranan penting pada pada pengeluaran sitokrom c dari mitokondria. Sitokrom c

pada sitoplasma akan mengaktivasi caspase 9 yang kemudian akan menginduksi apoptosis sel kanker.




**Gambar 2.8.6.** Peran ROS pada Apoptosis (Szeto, 2005).

## 2.9 Nuclear Factor κB (NF-κB)

Nuclear Factor κB (NF-κB) merupakan faktor transkripsi pada inti sel yang meregulasi ekspresi dari berbagai macam gen yang meregulasi apoptosis, replikasi virus, tumorgenesis, dan inflamasi (Ghobial *et. al.*, 2005; Yang *et. al.*, 1995). NF-κB merupakan mediator terpenting sel dalam melawan patogen (Schmidt *et. al.*, 1995; Pomerantz and Baltimore, 2002). Sebagian besar faktor transkripsi hanya dapat teraktivasi melalui stimulus yang sangat spesifik, seperti hormon. Sedangkan NF-κB dapat dengan mudah diaktivasi oleh berbagai macam stimulus, antara lain patogen seperti bakteri dan virus, radiasi, sitokin inflamasi, *Cell Adhesion Molecules* (CAMs), antigen, serum amiloid protein A, dan stres oksidatif (Schmidt *et. al.*, 1995; Yang *et. al.*, 1995).

### 2.9.1 Mekanisme Aktivasi NF-κB

Metabolit bakteri atau virus mengaktifkan Toll-Like Receptor (TLR) yang kemudian menginduksi aktivasi NF-κB melalui produksi sitokin proinflamasi.

Sitokin proinflamasi seperti TNF-α atau IL-1 menginduksi teraktivasinya NF-κB yang akan menginduksi agen proinflamasi lainnya. TNF-α atau IL-1 mengaktivasi NF-κB melalui fosforilasi IκB, dimana IκB merupakan suatu protein yang mengatur bentuk homo- atau heterodimer bentuk tidak aktif NF-κB di sitoplasma (Pomerantz and Baltimore, 2002; Ghobial *et. al.*, 2005). NF-κB dapat teraktivasi karena fosforilasi IKB, yang diikuti dengan degradasi, menyebabkan NF-κB aktif terlokalisasi kedalam inti (Ghobial *et. al.*, 2005). Didukung oleh Bowie dan O'Neill (2000), IKKα dan IKKβ diaktivasi oleh IL-1 dan TNF yang kemudian akan mengaktivasi NF-κB. IKKs merupakan bagian terbesar dari komplek multiprotein yang dinamakan IKK *signalsome*, yang mengandung IKAP dan NEMO (disebut juga IKKγ). IκBβ dapat difosforilasi oleh dua residu serine, S19 dan S23, melalui IKKα dan IKKβ yang sangat penting pada aktivasi NF-κB. Telah di identifikasi berbagai *upsteam activator* dan regulator dari IKKs antara lain MEKK1, TAK1, protein kinase C, MEKK-2,3, dan S6 kinase. Kinase-kinase tersebut meningkatkan aktivitas IKK dengan berbagai jalur yang akhirnya mengaktifkan NF-κB. Sebagai rute altenatif pengaktifan NF-κB, tergantung pada IκBα dan IκBβ. Subunit NF-κB p50 akan diterjemahkan menjadi prekusor p105 yang kemudian menonaktifkan p65. TNF diketahui dapat menginduksi p105 melalui fosforilasi kinase TPL-2 (Tumour Progression Locus 2 Kinase). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya terdapat banyak jalur yang dapat mengaktifkan NF-κB, dimana IKKs merupakan jalur aktivator utama. Fosforilasi IκB menyebakan IκB terdegradasi dan membebaskan NF-κB untuk bertranslokasi kedalam inti yang akan menginduksi ekspresi pada target gen. Kompleks IKK mengandung dua subunit kinase, IKKα, IKKβ, dan IKKγ/NEMO (nonkatalik subunit). TNF-α atau IL-1 dapat mendelesi IKKβ dan IKKγ dengan fosforilasi IκB, sementara IKKα

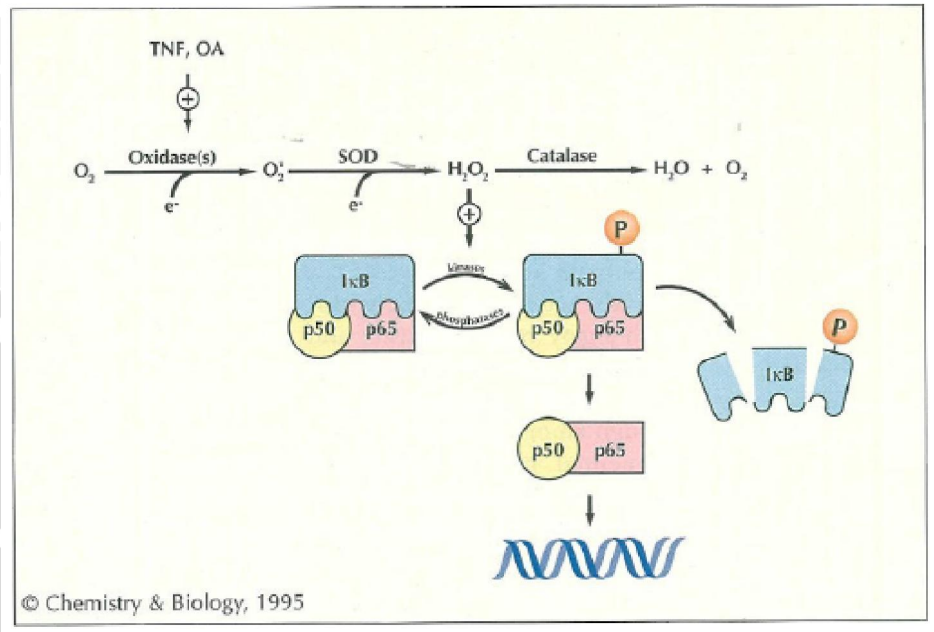
tidak mempengaruhi. NF-κB tersusun dari homo- dan heterodimer dari lima anggota Rel *family* meliputi NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), RelB, dan c-Rel. NF-κB1 dan NF-κB2 di produksi sebagai prekusor p105 dan p100, secara berurutan, mengikat DNA, dimerisasi terjadi, dan transkripsi sel terjadi (Pomerantz and Baltimore, 2002).

Di dalam inti NF-κB berikatan dengan berbagai macam sekuens gen yang mengaktivasi transkripsi. Dibawah keadaan fisiologi, aktivasi NF-κB resisten terhadap apoptosis karena mengaktivasi beberapa kompleks protein (TNFα, IAP, dan X-linked IAP). Bagaimanapun, untuk merespon stimulus tertentu, NF-κB dapat mengaktivasi beberapa protein pro-apoptosis seperti interferon-regulated factor-1, c-myc, p53, dan caspase 1. Pada beberapa infeksi virus tergantung pada aktivasi NF-κB (Ghobial *et. al.*, 2005).

**2.9.2 Aktivasi NF-κB melalui Model ROS**

Stres oksidatif didefinisikan sebagai peningkatan ROS intraseluler, seperti $H_2O_2$, $O_2^-$, dan radikal hidroksil –OH (Bowie and Luke, 2000). Berbagai macam studi menyebutkan bahwa *Reactive Oxigen Spesies* (ROS) memainkan peranan penting pada aktivasi NF-κB. Hidrogen peroksida ($H_2O_2$) berfungsi sebagai *second messenger* setelah stimulasi dari TNF-α (Schmidt *et. al.*, 1995). Pertama, $H_2O_2$ secara langsung dapat mengaktifkan NF-κB pada beberapa sel line, kedua beberapa tipe ROS meningkat dalam merespon aktivasi NF-κB, dan ketiga beberapa komponen antioksidan dapat menghambat aktifasi NF-κB. Sehingga didapatkan suatu kesimpulan bahwa (1) Aktivasi NF-κB melalui $H_2O_2$ atau penghambatan dengan antioksidan mempunyai penjelasan yang kompleks yang sering diinduksi oleh stimulus yang spesifik, (2) Efek antioksidan dan prooksidan

dalam mempengaruhi aktivasi NF-κB sangat tergantung pada tipe sel (Bowie and Luke, 2000).

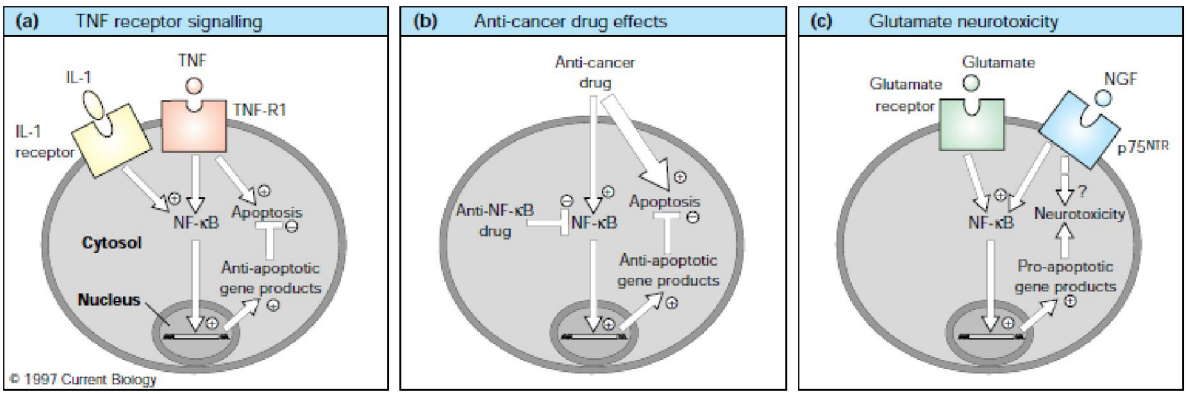



**Gambar 2.9.2.** ROS dan Aktivasi NF-κB (Schmidt *et. al.*, 1995).

### 2.9.3 Mekanisme NF-κB pada Apoptosis

Beberapa studi terbaru menyatakan bahwa ada hubungan antara aktivasi dari faktor transkripsi NF-κB dengan apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang sangat penting dalam mengeliminasi sel didalam tubuh. Apoptosis terjadi ketika ada rangsangan tertentu mengaktivasi caspase yang menyebabkan degradasi kromosom DNA dan apoptosis terjadi. Pada sel yang terpapar oleh agen yang dapat menyebabkan kerusakan DNA atau TNF-α dapat menginduksi aktivasi NF-κB, yang secara bersamaan menghambat sintesis RNA kemudian apoptosis. Sementara beberapa penelitian menyatakan aktivasi NF-κB merupakan bagian dari regulatori loop yang menghambat kematian sel dengan menginduksi gen anti-apoptosis. Dalam menghubungkan antara NF-κB dengan kematian berawal dari rendahnya aktivasi RelA (NF-κBp65) pada tikus karena

terjadi mutasi pada RelA. Beg dan Baltimore menyatakan bahwa fibroblast dan makrofag yang dari tikus dengan defisiensi NF-κB p65 sangat sensitive terhadap induksi TNF-α yang kemudian berapoptosis. Kesimpulan sederhana dari kasus tersebut bahwa satu atau lebih NF-κB-*dependent gene* yang diinduksi oleh TNF-α mencegah sel untuk berapoptosis. Hal ini menjelaskan bahwa pada kebanyakan tipe sel, TNF-α menjadi tidak sitotoksik karena sel terpapar oleh inhibitor sintesis RNA atau protein, yang akan memblok NF-κB-*dependent gene*. NF-κB dalam menghambat apoptosis juga ditunjukkan pada tidak aktifnya ekspresi NF-κB p65. Secara umum bentuk NF-κB berbentuk heterodimer, NF-κB p65 dan p50 yang terdapat dalam bentuk tidak aktif disitoplasma karena berikatan dengan IκB. Beberapa laporan menyebutkan bahwa sel dengan mutasi pada IκB-α dapat apoptosis dengan paparan TNF-α (Baichwal *et. al.*, 1997).




**Gambar 2.9.3.** Aktivasi NF-κB terhadap Apoptosis dan Anti-Apoptosis (Baichwal *et. al.*, 1997).

Mekanisme NF-κB dalam meregulasi kematian sel. **(a)** Tipe sel dan stimulus tertentu menentukan apakah aktivasi NF-κB akan melindungi sel dari apoptosis atau menginduksi kematian sel. Ikatan TNF-α pada reseptor TNF subtipe 1 (TNF-R1) dapat menginisiasi aktivasi NF-κB dan apoptosis. Aktivasi NF-κB menginduksi ekspresi gene yang menghambat jalur apoptosis.

Pencegahan induksi dari gen anti-apoptosis dapat dilakukan dengan mengganggu sintesis RNA atau protein, atau dengan menghambat aktivasi NF-κB, secara farmakologi dapat menginduksi apoptosis. IL-1 hanya dapat menginduksi NF-κB, sehingga pemberian IL-1 pada sel menyebabkan sel resisten terhadap berbagai sinyal apoptosis. **(b)** Beberapa obat-obatan antikanker mengaktivasi NF-κB untuk menginduksi kematian sel. Aktivasi NF-κB dapat menetralkan efek dari agen therapeutik, dan pengkombinasian obat-obatan antikanker dengan NF-κB *blocking* dapat meningkatkan efektivitas anti-kanker. **(c)** Pada sel neuron, glutamat menginduksi toksisitas sel melalui aktivasi NF-κB. Bagaimanapun NF-κB mungkin menginduksi ekspresi gen proapoptosis pada sel tersebut yang menfasilitasi kematian sel. Kesimpulan secara keseluruhan bagaimana NF-κB dapat menyebabkan kematian sel sangat tergantung pada (1) tipe sel dan (2) stimulus teraktivasinya NF-κB. Pada jenis sel yang berbeda, NF-κB dapat mempunyai fungsi yang berbeda (Baichwal *et. al.*, 1997).