

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Serviks

2.1.1 Definisi

Kanker merupakan penyakit dengan penyebab multifaktorial yang terbentuk dalam jangka waktu lama dan mengalami kemajuan melalui stadium yang berbeda – beda (Oemati *et al.*, 2011). Kanker dimulai ketika sel – sel mengalami pertumbuhan yang abnormal atau di luar kendali. Pertumbuhan sel abnormal tersebut cenderung menyerang jaringan disekitarnya dan menyebar ke organ tubuh lain yang letaknya jauh. Pertumbuhan sel kanker ini berbeda dari pertumbuhan sel normal. Sel kanker akan terus tumbuh dan membentuk sel kanker yang baru dan dapat menyerang jaringan yang lain. Ketika sel kanker masuk ke dalam aliran darah atau pembuluh getah bening maka dapat menyebar ke bagian tubuh yang lain dan mulai membentuk tumor yang baru menggantikan jaringan yang normal dimana proses ini disebut dengan metastasis (ACS, 2013a).

Kanker servik merupakan kanker yang dimulai di servik (leher rahim) bagian bawah rahim yaitu pada sel - sel yang melapisi leher rahim. Atau juga biasa disebut dengan *uterine cervix*. Sel – sel pada leher rahim tidak langsung menjadi kanker namun mengalami pra-kanker yang dapat berubah menjadi kanker. Perubahan dari pre-kanker menjadi kanker biasanya membutuhkan waktu beberapa tahun tapi bisa juga satu tahun. Pada beberapa wanita sel sel pra-kanker serviks akan berubah menjadi kanker. Tapi, tidak semua kejadian

pra-kanker pada sel serviks berubah menjadi kanker. Bagi kebanyakan wanita, sel – sel pra-kanker pada serviks akan tetap atau tidak berubah bahkan hilang tanpa pengobatan (ACS, 2013b).

2.1.2 Epidemiologi

Kanker serviks merupakan kanker urutan kedua yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia (Bosch *et al.*, 2002; Long, 2007). Dengan kejadian kanker serviks sebanyak 493.243 dan kematian yang terjadi sebanyak 273.505 pada tahun 2002. Sedangkan di Amerika Serikat terdapat 9.710 kejadian kanker serviks dan kematian sebanyak 3.700 pada tahun 2006 (Long, 2007).

Pada tahun 2008 kanker serviks menjadi peringkat ketiga kanker yang paling sering terjadi di dunia setelah kanker payudara dan kanker kolon (Jemal *et al.*, 2011). Yang artinya mengalami penurunan peringkat dibandingkan dengan tahun sebelumnya namun angka kejadiannya menjadi semakin banyak. Pada tahun 2008 angka kejadian kanker servik sebanyak 529.800 (9 % dari total kejadian kanker) dan terdapat 275.100 kasus kematian karena kanker serviks yang merupakan 8% dari total kematian akibat kanker. 85% kejadian kanker serviks dan terjadinya kematian akibat kanker servik terjadi pada negara berkembang seperti India, Afrika, Asia dan Amerika Selatan (Jemal *et al.*, 2011). Kejadian kanker servik di dunia bisa terjadi pada wanita dengan umur <45 tahun (Arbyn *et al.*, 2011).

Pada tahun 2002 Asosiasi Patologi Anatomi Indonesia bekerjasama dengan Perhimpunan Kanker Indonesia mencatat 2532 kasus kanker serviks di Indonesia. Pada tahun 2007 beberapa rumah sakit pendidikan di Indonesia

melaporkan terdapat 3112 kasus kanker serviks di Indonesia dengan berbagai variasi stadium (Aziz, 2009).

2.1.3 Stadium Kanker Serviks

Wiebe *et al* (2012) mengklasifikasikan stadium kanker serviks menjadi 4. Klasifikasi ini diadaptasi dari FIGO *Committee on Gynecologic Oncology* yang terakhir diperbaharui pada tahun 2009. Klasifikasi stadium kanker serviks berdasarkan FIGO *Committee on Gynecologic Oncology* adalah sebagai berikut (Wiebe *et al.*, 2012) :

a. Stage 1 yaitu karsinoma hanya terbatas pada serviks.

IA Kanker invasiv yang hanya bisa dideteksi dengan mikroskop.

IA1 Kanker invasiv yang terukur dari stroma kedalaman $\leq 3\text{mm}$ dan luas $\leq 7\text{mm}$.

IA2 Kanker invasiv yang terukur dari stroma dengan kedalaman $>3\text{mm}$ dan $<5\text{ mm}$ serta luas $\leq 7\text{mm}$.

IB Lesi secara klinis terbatas pada serviks atau lesi pre-klinis yang lebih besar daripada stadium IA.

IB1 Ukuran lesi tidak lebih besar dari 4 cm.

IB2 Ukuran lesi $> 4\text{cm}$.

b. Stage 2 yaitu karsinoma meluas mencapai uterus, namun tidak mencapai ke dinding pelvik atau sepertiga vagina.

IIA Karsinoma meluas sampai 2/3 dari vagina, tanpa ke parametrium.

IIA1 Lesi terlihat secara klinis $\leq 4\text{cm}$.

IIA2 Lesi klinis terlihat secara klinis $> 4\text{cm}$.

IIB Meluas sampai parametrium tapi tidak ke sisi dinding pelvik.

c. Stage 3 yaitu karsinoma telah meluas ke sisi dinding pelvik. Pada pemeriksaan rektal tidak ada ruang bebas antara tumor dan sisi dinding pelvik. Tumor meluas sampai sepertiga vagina. Terjadi hidronefrosis atau ginjal tidak berfungsi kecuali jika ada penyebab lain.

IIIA Meluas sampai vagina bawah tapi tidak ada perpanjangan ke sisi dinding pelvik.

IIB Perpanjangan ke sisi dinding pelvik atau hidronefrosis/ginjal tidak berfungsi.

d. Stage 4 yaitu karsinoma telah mencapai ke daerah pelvic atau secara klinis telah mencapai mukosa kandung kemih dan/atau rektum.

IVA Penyebaran ke organ pelvik yang berdekatan.

IVB Penyebaran ke organ yang letaknya jauh.

2.1.4 Patofisiologi

Studi epidemiologi secara jelas menyebutkan bahwa infeksi *Human papilloma virus* (HPV) merupakan penyebab utama pada kanker servik. Berdasarkan penelitian *International Agency for Research on Cancer* (IARC) padanegara, 99,7% kanker servik disebabkan oleh HPV (Clifford *et al.*, 2003). HPV merupakan virus *nonenveloped*, dan DNA beruntai ganda. Genom HPV berukuran kecil dengan ukuran 8kb dan mengkode 8 gen. Lebih dari 100 tipe HPV terkarakteriksasi namun hanya 40 tipe yang dapat menginfeksi saluran genital manusia yang menginduksi terjadinya kanker serviks. HPV ini digolongkan menjadi dua yaitu tipe resiko tinggi dan tipe resiko rendah. Klasifikasi ini berdasarkan kekuatan dari kejadian epidemiologi terkait dengan perkembangan kanker serviks. Ada 15 tipe virus HPV resiko tinggi yaitu HPV tipe

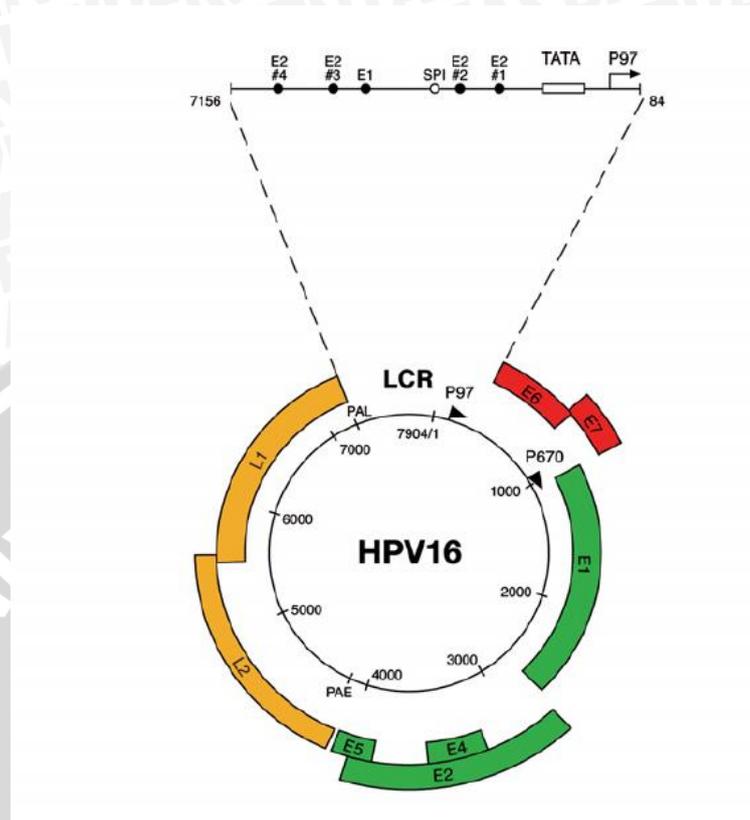
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 dan 82 (Paavonen, 2007). Sedangkan dalam ACS (2013b) disebutkan bahwa hanya HPV tipe 16, 18, 31, 33 dan 45 yang termasuk dalam virus HPV tipe resiko tinggi dan kebanyakan hanya HPV tipe 16 dan 18 yang paling banyak menyebabkan kanker serviks. HPV tipe 16 dan 18 merupakan virus yang konsisten menyebabkan 70% kanker serviks di dunia. HPV 16 itu sendiri juga termasuk HPV resiko tinggi yang menjadi penyebab sebanyak 50% terjadinya kanker serviks (Doorbar *et al.*, 2006). Sedangkan untuk HPV tipe resiko rendah ada 12 tipe virus yaitu HPV tipe 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 dan 81 (Paavonen, 2007). Dimana tipe 6 dan 11 jarang terkait dengan kanker serviks (ACS, 2013b).

Rusmana (2009) mendefinisikan HPV sebagai bagian dari keluarga *Papovaviridae*. *Papillomavirus* merupakan virus berukuran kecil berdiameter 45-55 nm. 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% *L1* mayor (mengkode protein kapsid mayor) dan 5% *L2* minor (mengkode protein kapsid minor). Bagian *E* merupakan 45% dari genom, terdiri atas *E1-E8*.

E2 dapat berperan sebagai faktor transkripsi dan dapat meregulasi promotor virus (*p97* pada HPV 16) serta mengontrol ekspresi onkogen virus yaitu *E6* dan *E7* (Doorbar *et al.*, 2006).

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 2.1 Organisasi genom HPV tipe 16 (Doorbar *et al.*, 2006)

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).

Terjadi disrupsi virus pada E1/E2 dan berintegrasi ke dalam DNA seluler. Disrupsi E2 menyebabkan pelepasan promotor virus atau onkogen E6 dan E7 dan meningkatkan ekspresi transforming dari gen ini. E6 dan E7 dapat mendegradasi p53 dan retinoblasma gen (RB) secara selektif (Bosch *et al.*,

2002). Onkoprotein E6 dan E7 merupakan penyebab terjadinya degenerasi keganasan (Rusmana, 2009).

Onkoprotein E6 berinteraksi dan menginaktivasi protein p53 (*tumor suppressor 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 servik didapatkan penurunan aktivitas *Bcl-2*, *Bax*, *caspase 3* dan *caspase 6* mempunyai fungsi antiapoptosis (Rusmana, 2009). Pada kanker serviks juga ditemukan terjadi peningkatan ekspresi dari HSP70 yang juga berperan sebagai antiapoptosis (Wu *et al.*, 2005).

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).

2.1.5 Pengobatan

Pada wanita, kanker servik dapat dicegah dengan mengikuti program skrining sitologi seperti *Papanicolaou* (Pap) *smear test*/VIA, tes HPV DNA, dan *molekular testing* (Hybrid capture II, Digene Diagnosis dst). 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 *microinvasive disease* adalah *simple hysterectomy*. Pendekatan konservatif dengan observasi setelah adekuat biopsi terkadang dipertimbangkan pada pasien dengan *microinvasive disease* 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).

2.1.6 Sel HeLa

Sel HeLa merupakan sel line immortal yang digunakan untuk penelitian di bidang kedokteran yang semuanya diturunkan dari sel kanker servik dari Henrietta Lacks, pasien yang meninggal karena kanker servik 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 2.1 Klasifikasi sel HeLa (Fountoulakis *et al.*, 2004)

Kingdom	<i>incertae sedis</i>
Filum	<i>incertae sedis</i>

Kelas	<i>incertae sedis</i>
Ordo	<i>incertae sedis</i>
Family	<i>HeLacytidae</i>
Genus	<i>HeLacyton</i>
Species	<i>HeLacyton gartleri</i>

2.1.6.1 Sel HeLa CCL-2

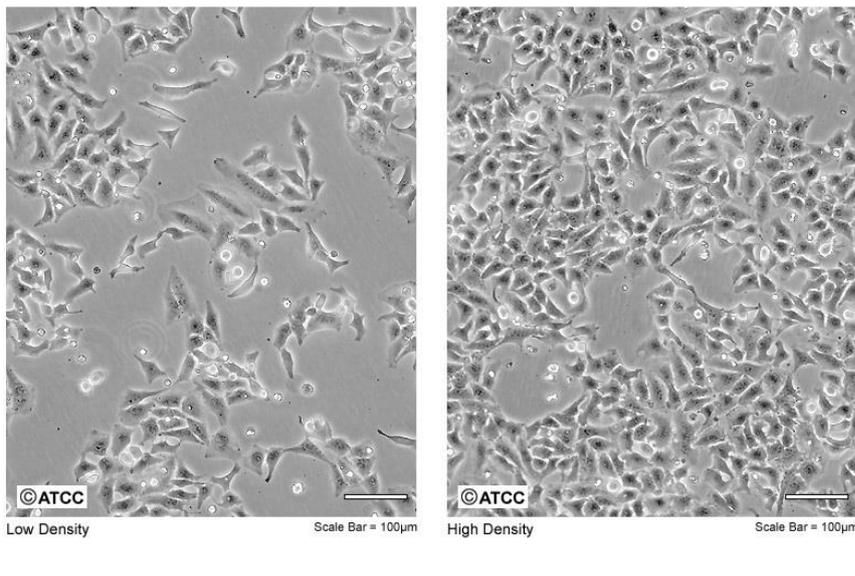
Sel HeLa CCL-2 merupakan sel HeLa yang diproduksi oleh *American Type Culture Collection (ATCC)* yang terinfeksi HPV tipe 16 dan HPV tipe 18 (ATCC, 2014). Pada Tabel 2.2 dapat dilihat spesifikasi dari Sel HeLa CCL-2 yang diperoleh dari ATCC. Pada Gambar 2.2 dapat dilihat penampakan mikroskopis sel HeLa CCL-2.

Tabel 2.2 Spesifikasi Sel HeLa CCL-2 (ATCC, 2014)

Organisme	<i>Homo sapiens</i> , manusia
Jaringan	Serviks
Jenis Penyakit	Adenokarsinoma
Tipe Sel	Epitel
Usia	31 tahun
Jenis Kelamin	Perempuan
Etnis	Hitam
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
Karakteristik	Ekspresi p53 rendah dan pRB dalam kadar yang normal

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



**Gambar 2.2 Penampakan mikroskopis Sel HeLa CCL-2 dari ATCC
(ATCC, 2014)**

2.2 Salam

2.2.1 Definisi dan Klasifikasi

Salam yang dikenal dengan nama ilmiah *Eugenia polyantha* atau *Syzygium polyanthum* Wight dikenal sebagai tanaman yang biasa dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai pelengkap bumbu dapur juga mempunyai khasiat sebagai obat (Hayati, 2011). Salam merupakan tanaman asli Asia Tenggara yang dapat ditemukan di Burma, Malaysia dan Indonesia (Wartini dkk., 2007). Salam mempunyai beberapa nama daerah yang berbeda beda seperti salam

(Madura); salam, ubar serai (Melayu); salam, manting (Jawa); salam, gowok (Sunda); Kastolam (Kangean). Sedangkan nama asing untuk salam adalah salam leaf , bay leaf (Inggris) (Hayati, 2012). Berikut merupakan klasifikasi dari tanaman salam (Hayati, 2012) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: <i>Eugenia</i>
Jenis	: <i>Eugenia polyantha</i>



Gambar 2.3 Daun Salam (Hayati, 2011)

2.2.2 Kandungan dan Manfaat

Beberapa spesies termasuk family *Eugenia* dan genus *Myrtaceae* seperti *Eugenia 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 antiulser, antidiabetes, anti inflamasi, dan antidiare karena potensi antioksidannya (Lelono *et al.*, 2009). Moi (2005) dan Hayati (2011) 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).

Perumal (2012) mengemukakan kandungan kimia dari daun *Eugenia polyantha* yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi adalah phenol dan beta karoten . Selain itu Har (2012) menunjukkan keberadaan gallic acid dan caffeic acid sebagai komponen mayor phenolic acid pada ekstrak methanol daun *Eugenia polyantha*. Ekstrak ethanol 96% daun *Eugenia polyantha* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} adalah 26,401 $\mu\text{g/mL}$ (Hayati, 2011). Wong (2006) menyatakan bahwa *aqueous* ekstrak daun *Eugenia polyantha* merupakan salah satu tanaman yang memiliki antioksidan yang tinggi dan juga memiliki TPC yang tinggi. Ekstrak daun salam memiliki aktivitas sebagai antitumor, dekontaminasi bakteri, sedangkan ekstrak kulit kayu dapat digunakan sebagai antioksidan yang kuat.

Har (2012) menunjukkan keberadaan asam galat dan asam cafeic sebagai komponen mayor fenol pada ekstrak metanol daun *Eugenia polyantha*. Asam galat memiliki aktivitas antikaner pada yang diuji pada sel kanker prostat DU145 yang menyebabkan penurunan pada CDK4, CDK6 dan CDK2. Serta menginduksi apoptosis melalui peningkatan caspase-9, caspase-3 dan pembelahan *poli (ADP) ribose polymerase* serta menurunkan kadar protein dari berbagai cyclin seperti D1, cyclin D3, cyclin A, dan cyclin B1. Selain itu asam

galat juga menyebabkan peningkatan pada level protein dari Cip1/p21 (Agarwal *et al.*, 2006).

Asam galat juga memiliki aktivitas antikanker pada Jurkat cell yang menyebabkan penghambatan pada ekspresi HSP70 dan menghambat RCHY1 (Das *et al.*, 2012). Selain itu juga disebutkan bahwa ekstrak tanaman yang mengandung 0,004% asam galat memiliki aktivitas dalam menghambat ekspresi HSP70 dan HSP22 (Schriner *et al.*, 2012).

Asam galat yang merupakan komponen mayor dari fenol juga memiliki aktivitas dalam mengaktivasi apoptosis melalui ROS. Pemberian asam galat pada *promyelocytic* leukemia menyebabkan peningkatan ROS intraseluler setelah pemberian asam galat selama 5 menit (Inoue *et al.*, 2000). Penelitian ini juga didukung oleh Chen *et al.* (2009) dimana asam galat dapat meningkatkan produksi ROS pada sel kanker prostat DUI45 yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

2.3 Sirih Merah

2.3.1 Definisi dan Klasifikasi

Sirih merah merupakan salah satu jenis tanaman hias yang bisa menjadi obat (Hayati, 2011). Sirih merah merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai tanaman hias pada tahun 1900-an namun sekarang menjadi berubah fungsi menjadi tanaman obat (Alfarabi, 2010). Nama lain dari sirih merah ini adalah Kerapang Timang (Wicaksono *et al.*, 2009). Berikut merupakan klasifikasi dari sirih merah (Alfarabi *et al.*, 2010):

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Magnoliidae
Bangsa : Piperales
Suku : Piperaceae
Marga : *Piper*
Jenis : *Piper crocatum*



Gambar 2.4 Daun Sirih Merah

2.3.2 Morfologi

Sirih merah merupakan tanaman merambat. Panjang daun sirih merah adalah 5 - 8 cm, sedangkan lebarnya 2-5 cm (Hayati, 2011). Batangnya bersulur bersulur dan beruas dengan jarak buku 5 – 10 cm dengan setiap buku tumbuh bakal akar. Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata, mengkilap atau tidak berbulu dan mempunyai warna yang khas yaitu permukaan atas hijau gelap berpadu dengan tulang daun dan bagian bawah daun berwarna merah hati keunguan, daun berasa pahit, berlendir

serta mempunyai bau tidak khas seperti sirih. Sirih merah bisa tumbuh dengan baik di tempat teduh, mendapatkan 60 – 75% cahaya matahari, tidak terkena banyak sinar matahari. (Alfarabi *et al.*, 2010).

2.3.3 Kandungan dan Manfaat

Hadi (2012) dari ekstrak methanol daun *Piper crocatum* 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. Komponen senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol 70% daun *Piper crocatum* adalah golongan asam lemak, terpenoid, flavonoid, steroid, alkaloid, pirimidin, minyak atsiri, polifenol, dan vitamin E. Daun sirih merah secara tradisional juga dapat digunakan untuk mengobati diabetes mellitus, tekanan darah tinggi, asam urat, batu ginjal, ambien dan keputihan. Secara ilmiah sirih merah juga berfungsi sebagai antihiperqlikemia dan memiliki potensi sebagai hepatoprotektor (Alfarabi *et al.*, 2010). *Piper crocatum* secara tradisional di Indonesia digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya kanker payudara Sedangkan di Borneo secara empiris juga digunakan sebagai obat kanker (Wicaksono *et.al*, 2009). Secara tradisional untuk pengobatan tumor payudara digunakan 1 lembar daun sirih merah dengan 1 gelas air dan direbus (Hidayat, 2009).

Ekstrak etanol daun sirih merah memiliki aktivitas yang potensial sebagai antioksidan (Alfarabi, 2010). Ekstrak metanol daun *Piper crocatum* memiliki aktivitas dalam menghambat proliferasi sel yang di teliti pada kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} 44,25 μ g/mL. Aktivitas antiproliferasi dari daun sirih merah pada sel 747D melalui penghambatan pada fosforilasi p44/p42 (Wicaksono *et*

al., 2009). Ekstrak etanol 96% daun *Piper crocatum* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 38,393 $\mu\text{g/mL}$ (Hayati, 2011).

Kandungan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan aktivitas dalam menghambat ekspresi HSP70. Namun tidak semua jenis flavonoid dapat menghambat ekspresi dari HSP70. Flavonoid seperti quercetin, taxifolin, kaemferol dan isorhamnetin memiliki aktivitas dalam menghambat ekspresi HSP70. Potensi penghambatan pada ekspresi HSP70 tergantung pada keberadaan $-\text{OH}$ di cincin B dan saturasi dari ikatan pada C2-C3 (Rusak *et al.*, 2002). Penghambatan pada ekspresi HSP70 akan menghambat proliferasi sel dan menginduksi terjadinya apoptosis sel (Wu *et al.*, 2005).

2.4 Apoptosis

2.4.1 Definisi

Apoptosis atau kematian sel terprogram sangat penting dalam mengontrol jumlah sel dan proliferasi (Ghobrial *et al.*, 2005). Ada 2 jalur yaitu apoptosis intrinsik dan apoptosis ekstrinsik. Untuk intrinsik disebut dengan jalur mitokondria dan ekstrinsik disebut dengan jalur *death receptor* (Rerole *et al.*, 2010).

2.4.2 Apoptosis Intrinsik

Apoptosis intrinsik melibatkan produksi atau aktivasi dari molekul pro-apoptosis selama sinyal stress intraseluler. Molekul pro-apoptosis ini akan bertemu di mitokondria untuk menyebabkan pelepasan molekul apoptogenik

mitokondria di bawah kontrol dari protein Bcl-2. Keluarga (family) Bcl-2 dibedakan menjadi 3 yaitu (Ghobrial *et al.*, 2005; Rerole *et al.*, 2010):

- Anggota anti-apoptosis seperti Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 dan Mcl-1 yang berfungsi sebagai repressor apoptosis dengan memblok pelepasan sitokrom c.
- Anggota proapoptosis seperti Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim dan Hrk berfungsi sebagai promotor pelepasan dari sitokrom c.

Anggota proapoptosis akan mengalami modifikasi pasca translasi termasuk defosforilasi dan pemotongan sehingga akan mengaktifasi protein proapoptosis dan terjadi translokasi ke mitokondria yang akan memimpin terjadinya apoptosis. Menanggapi stimulus apoptosis, mitokondria akan menjadi permeabel kemudian mitokondria akan melepas molekul apoptogenik mitokondria (Ghobrial *et al.*, 2005). Salah satu molekul apoptogenik mitokondria yang dilepas adalah sitokrom c. Sitokrom c akan dilepas ke sitosol yang berinteraksi dengan Apaf-1 (*Apoptotic protease activation factor-1*) untuk membentuk apoptosom yang akan mengaktifasi pro-caspase9 menjadi caspase-9 dan caspase-9 akan mengaktifasi caspase-3 dan pada akhirnya akan terjadi apoptosis (Rerole *et al.*, 2010 ; Ghobrial *et al.*, 2005 ; Lanneau *et al.*, 2008). Molekul apoptogenik mitokondria lain yang akan dilepas adalah Smac/Diablo dan Htra2/Omi yang mengaktifasi apoptosis dengan menetralkan aktivitas penghambatan dari IAPs (*Inhibitory Apoptotic Proteins*) yang berkaitan penghambatan caspase-3 (Lanneau *et al.*, 2008; Rerole *et al.*, 2010).

2.4.3 Apoptosis Ekstrinsik

Jalur apoptosis ekstrinsik di sebabkan oleh protein membran plasma dari receptor TNF (*Tumor Necrosis Family*) yang merupakan *death receptor* dan secara langsung menyebabkan aktivasi ke receptor proksimal caspase-8 atau caspase-10 pada *death-inducing signaling kompleks*. Caspase-8 secara langsung mengaktifasi *downstream cascade* dari caspase atau Bid ke dalam bentuk terpotong yang aktif yang dinamakan tBid yang menghubungkan ke apoptosis jalur ekstrinsik melalui permeabilisasi mitokondria (Lanneau *et al.*, 2008; Rerole *et al.*, 2010 ;).

Salah satu anggota dari *Tumor necrosis Family receptor* adalah Fas. Fas merupakan salah satu jalur terjadinya apoptosis ekstrinsik. Ketika stimulus kematian memicu jalur ini, membran yang mengikat Fas-L berinteraksi dengan Fas kompleks yang tidak aktif dan membentuk kompleks signaling yang menginduksi kematian sel. Kompleks Fas signaling yang menginduksi kematian terdiri dari adaptor protein FADD (*Fas-associated death domain*) caspase-8 dan caspase-10 dimana kompleks ini akan mengaktifasi caspase-8 yang pada gilirannya akan mengaktifasi caspase. Pada beberapa sel, caspase-8 akan berinteraksi dengan jalur apoptosis intrinsik dengan cara memotong Bid yang akan menyebabkan pelepasan sitokrom c. Regulator pada apoptosis ekstrinsik jalur fas antara lain NF-kB dan AP-1 (*activating protein-1*). Penghambat lain pada apoptosis intrinsik jalur Fas adalah FAP01, FADD-protein seperti IL-1 β , decoy receptor terlarut seperti DcR3, DcR1 dan DcR2 yang bersifat antagonis terhadap stimulasi dari Fas dengan cara berkompetisi dengan ligan fas (Ghobrial *et al.*, 2005).

2.4.4 Apoptosis Akhir

Caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) dikenal sebagai penentu terjadinya program apoptosis. Caspase dikategorikan menjadi 2 kelompok, inisiator awal dan eksekutor akhir. Caspase awal dapat diaktifkan oleh *cell-death signal* (misalnya TNF- α), kemudian caspase awal akan mengaktifkan caspase akhir yang secara langsung mengaktifkan kematian sel. Caspase 2, 8, 9, dan 10 merupakan caspase inisiator, sementara caspase 3, 6, dan 7 merupakan caspase efektor (Friedlander, 2003).

Caspase merupakan jalur terakhir pada berbagai signal 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, yang mana memotong inhibitor dari *caspase-activated deoxyribo nuclease* (CAD), kemudian *caspase-activated deoxyribo nuclease* (CAD) menjadi aktif untuk menyebabkan apoptosis pada inti sel (Ghobrial *et al.*, 2005).

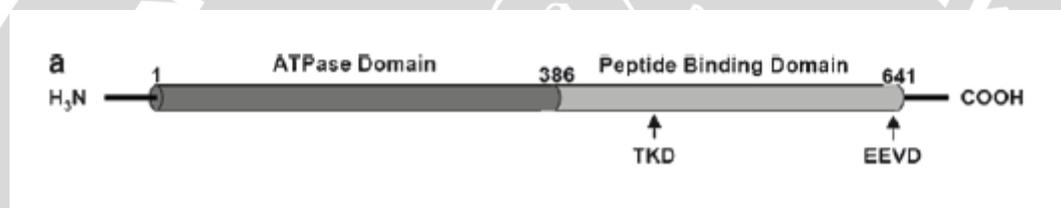
2.5 HSP70

2.5.1 Definisi dan Peran HSP70

Pada mamalia golongan HSP diklasifikasikan menjadi 5 berdasarkan ukuran molekulnya yaitu HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 dan HSP dengan berat molekul 15-30 kDa termasuk HSP27. Golongan HSP dengan ukuran molekul yang besar termasuk HSP70 adalah merupakan chaperon yang tergantung dengan ATP (Rerole *et al.*, 2010). Chaperon merupakan protein yang sifatnya memodifikasi struktur dan berinteraksi dengan protein yang lain (Ciocca

dan Calderwood, 2005). Sel manusia mengandung beberapa anggota keluarga HSP70 yaitu HSP70, HSC70, mitokondria HSP75 dan GRP78 yang terdapat di retikulum endoplasma (Rerole *et al.*, 2010). Jolly and Morimoto (2000) menyebutkan bahwa keluarga HSP70 pada mamalia memiliki 4 chaperon yaitu HSC70 yang terletak di sitosol/nukleus, HSP70 yang terletak di sitosol/nukleus, BIP/GRP78 yang terletak di retikulum endoplasma dan mHSP70 yang terletak di mitokondria.

Struktur dari HSP70 terdiri dari dua bagian fungsional yaitu *Peptide Binding Domain* dan ATPase domain seperti pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur HSP70 (Rerole *et al.*, 2010)

Aktivitas chaperon HSP70 diregulasi oleh co-chaperon seperti Hip, CHIP atau Bag-1. Co-chaperon ini akan mengikat HSP70 dan memodulasi fungsi chaperon HSP70 dengan meningkatkan atau menurunkan afinitas HSP70 untuk substrat tertentu melalui stabilisasi dari ADP atau ATP yang terikat pada HSP70 (Rerole *et al.*, 2010).

HSP70 merupakan sitoprotektif yang mempunyai fungsi anti-apoptosis dengan menghambat efektor kunci pada mitokondria dan di luar mitokondria (Rerole *et al.*, 2010). Ekspresi yang berlebih dari HSP70 diinduksi oleh berbagai stimulus seperti kondisi hipertermia, stress oksidatif, penghambatan tyrosin kinase oleh staurosporine, ligase death receptor Fas/Apo-1/CD95, syok panas, stres fisik, stres kimia, logam berat, kondisi patologis seperti iskemi dan

reperfusi, inflamasi, kerusakan jaringan, infeksi dan mutan protein (Ciocca dan Calderwood, 2005; Jolly dan Morimoto, 2000; Rerole *et al.*, 2010). Ekspresi HSP70 diinduksi oleh sejumlah onkogen termasuk c-myc dan adenovirus E1A (Barnes *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005).

Selain memiliki fungsi sebagai anti-apoptosis golongan HSP juga memiliki peran dalam diferensiasi sel. Pada pembentukan sel darah merah, HSP70 terakumulasi dalam nukleus dari eritroblast (Rerole *et al.*, 2010). HSP70 juga berperan penting dalam proliferasi sel tumor dan terkait dengan ISCC (*Invasive Squamous Cell Carcinoma*) dibandingkan dengan CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*). HSP70 juga merupakan dapat digunakan sebagai evaluasi dari malignansi (Kim *et al.*, 1998). HSP70 juga ditemukan pada medium ekstraseluler yang berfungsi sebagai immunogenik dan berkontribusi dalam pengawasan tumor (Rerole *et al.*, 2010).

Pada jaringan normal dan tidak mengalami stres ekspresi HSP70 sangat rendah. Setelah terjadi stres seluler (misalnya stres yang diinduksi oleh onkogen) tingkat ekspresi HSP70 meningkat melalui faktor transkripsi (Messey *et al.*, 2009).

Pada beberapa kanker terjadi ekspresi yang berlebih dari *heat shock protein* (HSP) salah satunya adalah overekspresi dari HSP70 (Barnes *et al.*, 2001; Ciocca dan Calderwood, 2005). Seperti pada kondisi kanker payudara dan kanker serviks terjadi ekspresi yang berlebih dari HSP70 (Barnes *et al.*, 2001).

Terjadinya ekspresi yang berlebih dari HSP70 pada beberapa kanker seperti kanker payudara dan kanker serviks berkaitan dengan peningkatan proliferasi, metastase, memblok terjadinya apoptosis, resistensi kemoterapi, diferensiasi sel, invasi, penekanan pada sistem imun, prognosis penyakit, serta

mengontrol siklus sel (Barnes *et al.*, 2001; Ciocca dan Calderwood., 2005; Rerole *et al.*, 2010). HSP70 juga berkontribusi pada kelangsungan hidup sel kanker melalui beberapa jalur anti-apoptosis (Messey *et al.*, 2009). Sedangkan dalam Wu *et al* (2005) HSP70 diketahui sebagai sebagai faktor penentu dari kematian sel dan transformasi sel. HSP70 bisa berperan sebagai perlindungan otot jantung (Svensonn *et al.*, 2007). Aktivitas HSP70 dapat juga mempengaruhi pembentukan tumor dengan meregulasi aktivitas protein yang terlibat pada siklus sel (Wu *et al.*, 2005).

Penekanan pada ekspresi HSP70 disebutkan dapat menghambat proliferasi sel, menginduksi terjadinya apoptosis, menurunkan ukuran tumor, dan mengaktivasi Bax namun tidak berefek pada stres retikulum endoplasma (Rerole *et al.*, 2010; Soemasu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2005).

Chaperon HSP70 juga mempengaruhi pembentukan tumor dengan meregulasi aktivitas protein yang terlibat dalam siklus sel (Wu *et al.*, 2005). Hal ini juga didukung pada penelitian yang dilakukan oleh Barnes *et al* (2001) disebutkan bahwa ekspresi HSP70 dapat meningkatkan pertumbuhan sel dengan cara memperpendek fase G0/G1 dan fase S dari siklus sel.

Menetralkan HSP70 dapat dijadikan sebagai strategi yang atraktif dalam terapi antikanker. Terapi yang berperan sebagai inhibitor HSP70 akan sangat berguna digunakan dalam terapi kanker baik secara tunggal maupun kombinasi dengan obat lain (Rerole *et al.*, 2010).

2.5.2 Peran HSP70 dalam menghambat apoptosis

HSP telah menunjukkan dapat memblokir apoptosis dengan mengganggu aktivasi dari caspase-3. Ekspresi yang berlebih dari HSP70 menghambat

apoptosis dan mencegah aktivasi caspase-3 pada banyak model sel yang berbeda dengan berbagai stres seluler termasuk akumulasi protein yang gagal melipat, ROS, dan kerusakan DNA. Sebaliknya, dengan strategi siRNA, HSP70 dapat meningkatkan sensitivitas sel ke stimulasi terjadinya apoptosis. Pada beberapa konteks sel, penurunan HSP70 merupakan pemicu apoptosis melalui aktivasi caspase-3 pada ketidakberadaan dari stimulus stres. Oleh karena itu, HSP secara langsung maupun tidak langsung berperan dalam memodulasi aktivitas caspase-3 (Rerole *et al.*, 2010). Selain itu HSP70 juga mempengaruhi dari protein yang meregulasi terjadinya apoptosis seperti p53, NF- κ B dan PI3K.

HSP70 dapat memblok apoptosis intrinsik, apoptosis ekstrinsik melalui interaksi dengan protein kunci. Selain itu HSP70 juga memblok apoptosis independent caspase dan juga dapat meningkatkan proliferasi sel atau pertahanan sel. Pada Gambar 2.6, 2.7 dan 2.8 dapat dilihat secara skematis peran HSP70 pada apoptosis dan survival sel/proliferasi sel (Rerole *et al.*, 2010; Lanneau *et al.*, 2008).

HSP70 dapat memblok apoptosis intrinsik (apoptosis mitokondria) pada tiga tingkatan yaitu :

- a. Sebelum mitokondria sehingga memodulasi jalur signaling (memodulasi aktivasi dari Akt, JNK atau ERK) (Lanneau, 2008). HSP70 juga memblok terjadinya apoptosis pada step awal yaitu dengan mencegah aktivasi JNK (Jolly dan Morimoto, 2000).
- b. Pada mitokondria dengan mengontrol pelepasan molekul apoptogenik dimana HSP70 berinteraksi dengan Bax. Interaksi ini akan memblok translokasi Bax yang kemudian akan menurunkan permeabilitas mitokondria lalu mitokondria tidak akan melepas sitokrom c sehingga

tidak akan terbentuk kompleks apaf-1 dan procaspase-9 yang menyebabkan caspase-9 tidak teraktivasi, caspase-3 juga tidak akan teraktivasi melalui jalur intrinsik dan tidak terjadi apoptosis (Rerole *et al.*, 2010; Lanneau, 2008).

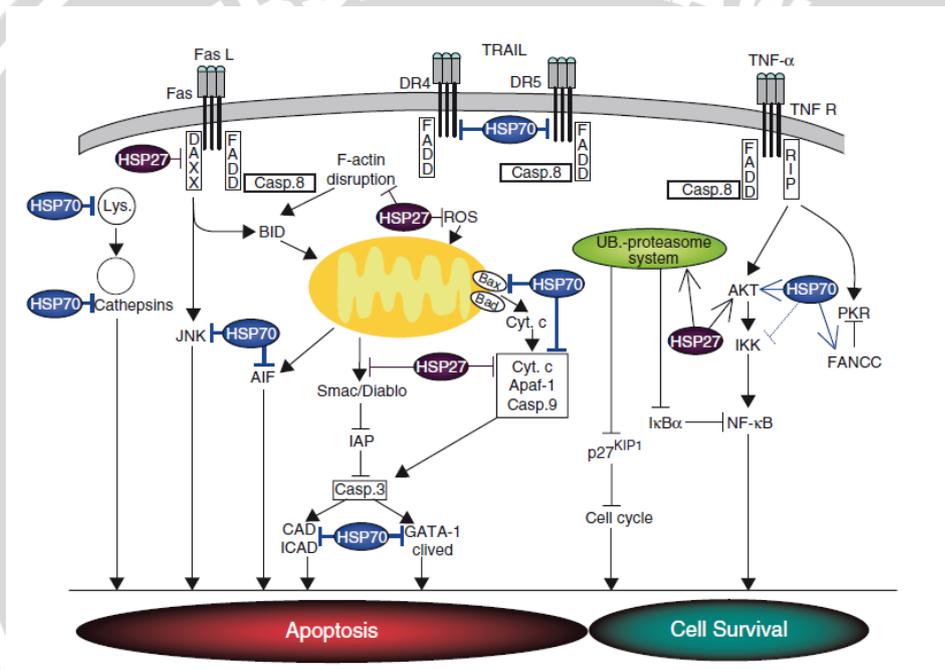
- c. Di luar mitokondria dengan memblok apoptosis dengan cara berinteraksi dengan Apaf-1 pada bagian ATPase (Rerole, 2010; Lanneau *et al.*, 2008). HSP70 secara langsung mengikat Apaf-1 sehingga mencegah terbentuknya kompleks dengan procaspase-9 yang menyebabkan caspase-9 tidak teraktivasi, caspase-3 juga tidak akan teraktivasi melalui jalur intrinsik dan tidak terjadi apoptosis (Beere *et al.*, 2000; Rerole *et al.*, 2010; Jolly dan Morimoto, 2000).

HSP70 dapat memblok apoptosis ekstrinsik dengan cara:

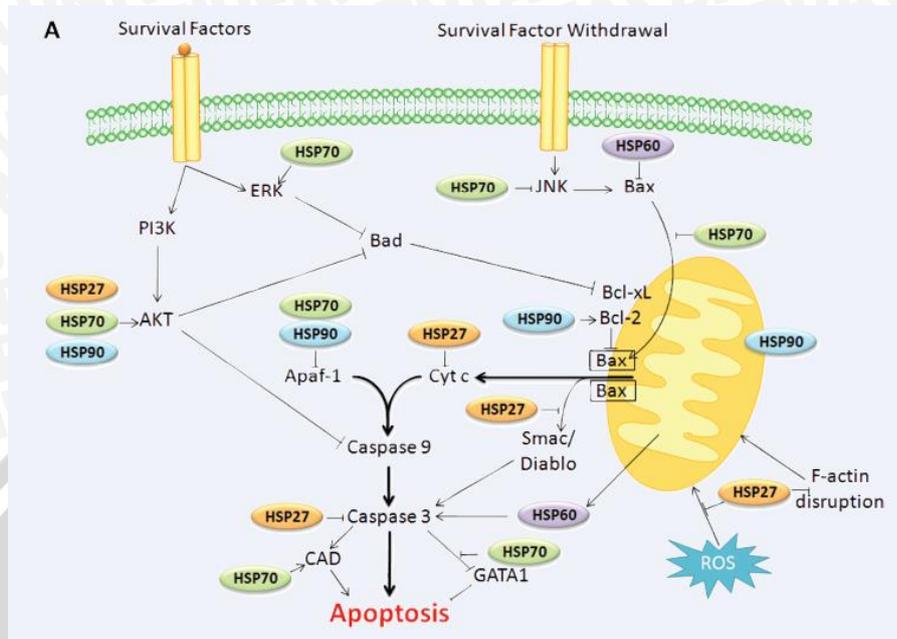
- a. HSP70 menghambat TNF-alfa yang menginduksi kematian sel. HSP70 akan berinteraksi dengan FANCC (*Fanconi anemia Complementatin group C*) melalui bagian ATPase dan bersama dengan HSP40 menghambat TNF melalui kompleks HSP70, FANCC, PKR. Selain itu HSP70 dapat memblok pembelahan Bid yang merupakan salah satu keluarga Bcl-2 anggota proapoptosis (Rerole *et al.*, 2010 : Lanneau, 2008).
- b. HSP70 melalui rekrutmen TRAIL dan FADD dapat menghambat aktivasi dari caspase 8 (Lanneau, 2008).

HSP70 juga dapat menghambat jalur apoptosis independent caspase yaitu dengan cara :

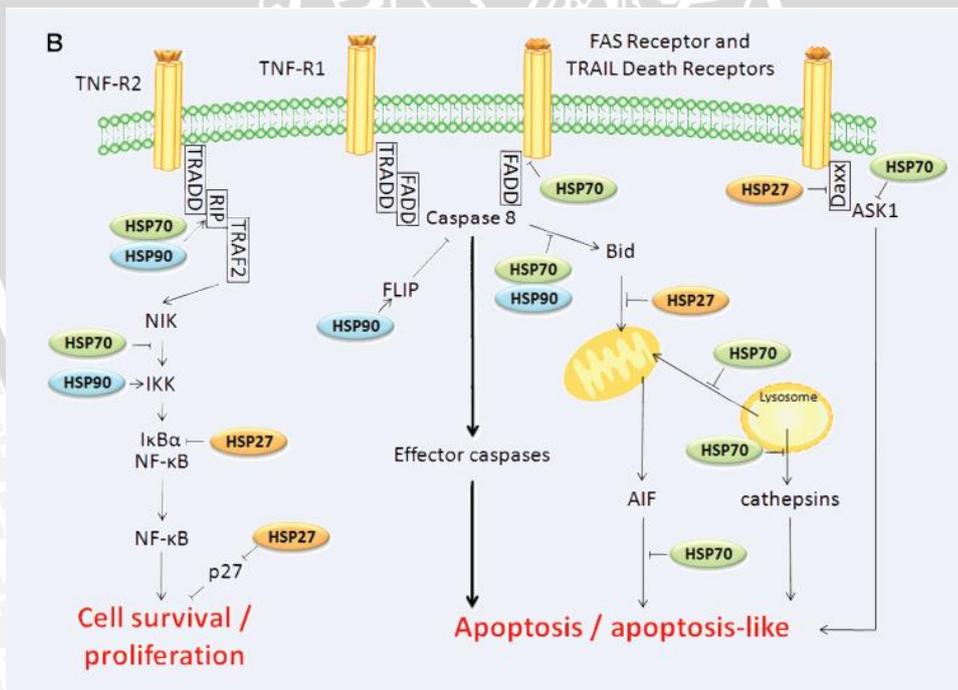
- HSP70 secara langsung mengikat AIF dan menghambat AIF yang menginduksi kondensasi kromatin, menetralkan efek apoptogenik AIF dan memblokir import AIF ke intisel (Rerole *et al.*, 2010).
- Menghambat pelepasan cathepsine dari lisosom (Rerole *et al.*, 2010 ; Lanneau *et al.*, 2008).



Gambar 2.6 Peran HSP70 dalam apoptosis dan pertahanan sel
(Rerole *et al.*, 2010)



Gambar 2.7 Peran HSP70 dalam menghambat apoptosis intrinsik (Lanneau et al., 2008)

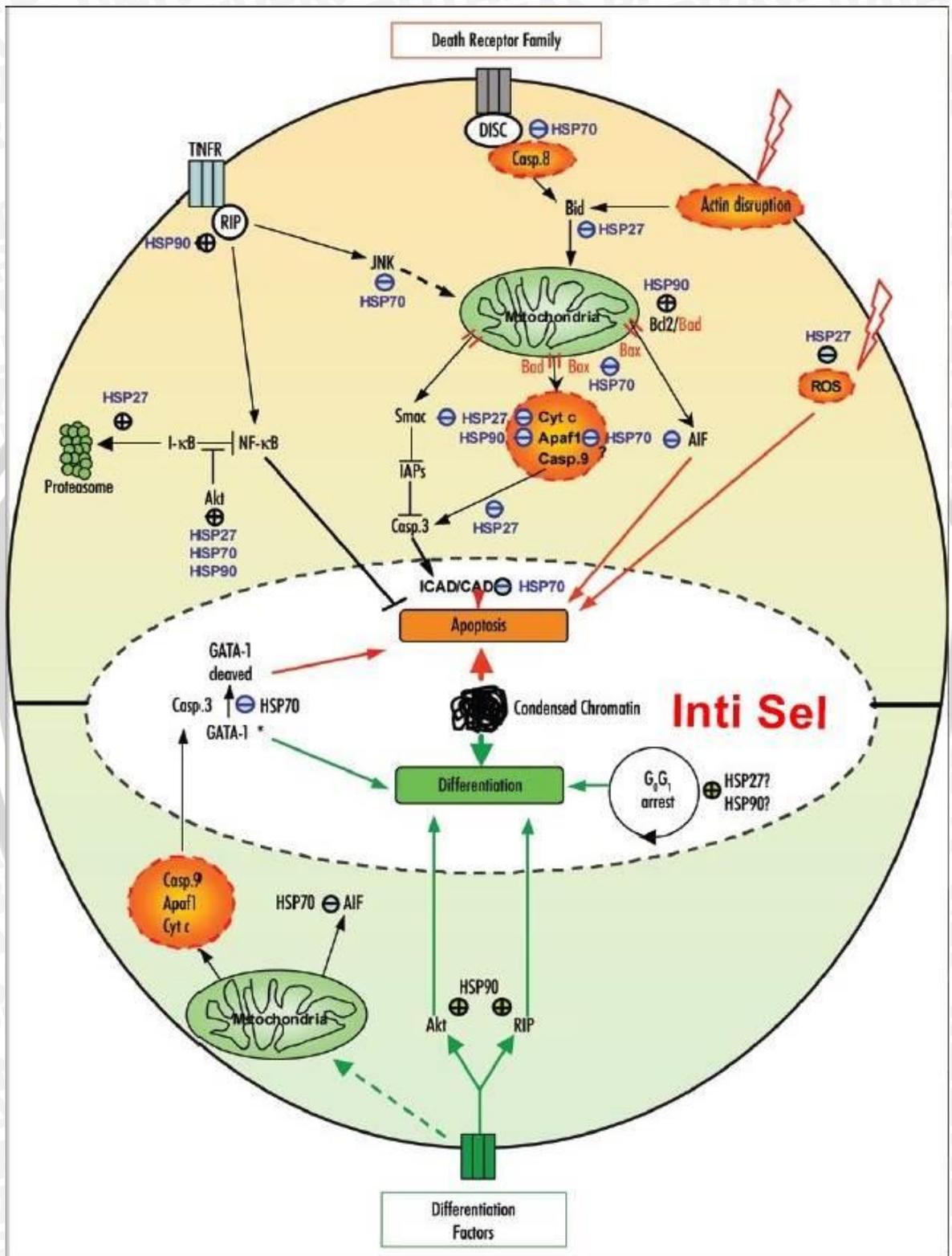


Gambar 2.8 Peran HSP70 dalam apoptosis ekstrinsik, apoptosis independent caspase dan proliferasi sel (Lanneau et al., 2008)

2.5.3 Peran HSP70 di Intisel

Peran HSP70 intisel dapat dilihat pada Gambar 2.9. HSP70 akan berlokalisasi ke intisel dan akan berinteraksi dengan GATA-1 di intisel. HSP70 akan melindungi GATA-1 dari pembelahan caspase-3 yang memediasi pembelahan GATA-1 melalui daerah ikatan peptidanya (Ribeil *et al.*, 2007). GATA-1 merupakan faktor transkripsi yang menjadi target akhir dari caspase3 (Rerole *et al.*, 2010). Caspase3 akan menyebabkan GATA-1 membelah dan menginduksi terjadinya apoptosis, namun karena pembelahan GATA-1 dihambat oleh HSP70 maka apoptosis tidak terjadi walaupun caspase-3 telah teraktivasi (Lanneau *et al.*, 2007). HSP70 berperan dalam melindungi GATA-1 dari terjadinya pembelahan GATA-1 karena adanya caspase-3 maka sebagai konsekuensinya maka tidak akan terjadi apoptosis. Selain GATA-1, CAD (*Caspase Activated DNase*) juga merupakan salah satu protein yang menjadi target akhir dari caspase-3. HSP70 juga meregulasi aktivitas enzimatik dan pelipatan yang sesuai dari CAD (Rerole *et al.*, 2010). Selama fase akhir dari apoptosis DNA kromosom dicerna oleh CAD, dimana aktivitas dari CAD ini diregulasi oleh HSP70 (Lanneau *et al.*, 2007).

Penurunan HSP70 akan menyebabkan pembelahan GATA-1 dan menyebabkan terjadinya kematian sel (Ribeil *et al.*, 2007). Pernyataan ini juga didukung oleh Frisan *et al* (2011) yang menyebutkan bahwa penurunan HSP70 di intisel dapat meningkatkan pembelahan dari GATA-1.



Gambar 2.9 Peran HSP70 di Intisel (Lanneau et al., 2007)

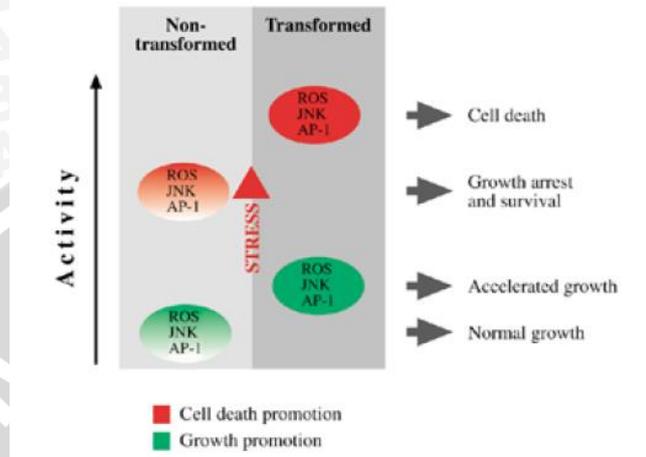
2.6 ROS

2.6.1 Peran ROS dalam apoptosis

ROS diproduksi oleh mitokondria. Kadar ROS yang rendah meregulasi signaling pada sel dan berperan penting dalam proliferasi sel normal. Produksi ROS pada sel kanker mengalami peningkatan (Benhar *et al.*, 2002). Onkogen menyebabkan terjadinya peningkatan dari produksi ROS. Peningkatan ROS terjadi pada kebanyakan kanker karena terkait dengan metabolisme aktif dan stimulasi oncogenic (Trachootam *et al.*, 2006). ROS memiliki beberapa fungsi diantaranya sebagai inisiasi tumor, progresi dan pengontrolan. Sedangkan pada sel di bawah kondisi stres ROS berperan dalam mengaktivasi dan memodulasi terjadinya apoptosis sel. Peningkatan kadar ROS dapat menginduksi terjadinya apoptosis dengan menstimulasi signaling molekul proapoptosis seperti ASK1, JNK dan p38. Peningkatan ROS juga berperan penting pada p53 yang menginduksi apoptosis. Selain itu peningkatan ROS juga berperan langsung dalam mempercepat depolarisasi mitokondria (Benhar *et al.*, 2002).

Pada Gambar 2.10 dapat dilihat perbedaan kadar ROS dan perbedaan fungsinya pada sel normal dan sel yang mengalami transformasi karena stimulus stress. Pada sel normal ROS pada kadar yang rendah dapat berfungsi dalam menghasilkan pertumbuhan sel yang normal dan jika terjadi peningkatan ROS pada level tertentu akan menyebabkan terjadinya pertumbuhan yang tidak teratur serta pertahanan agar sel hidup. Sedangkan pada sel yang mengalami transformasi maka ROS pada kadar rendah akan mempercepat terjadinya pertumbuhan namun jika kadar ROS ditingkatkan pada kadar tertentu maka akan mestimulasi terjadinya kematian sel atau apoptosis (Benhar *et al.*, 2002). Sel

yang bertransformasi lebih sensitive terhadap ROS yang menginduksi apoptosis. Karena ROS basal yang tinggi (Trachootam *et al.*, 2010).



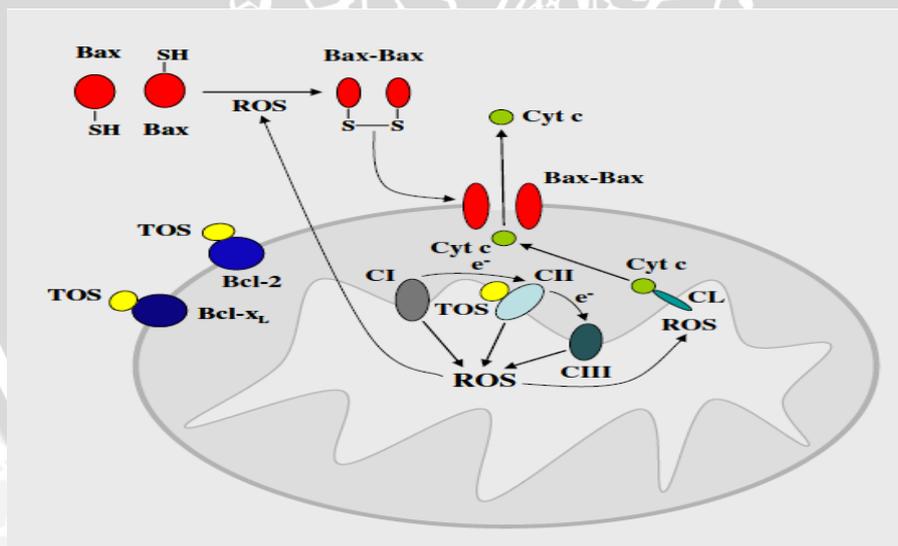
Gambar 2.10 Perbedaan fungsi dan kadar ROS pada sel normal dan sel yang bertransformasi (Benhar *et al.*, 2002)

Benhar *et al* (2002) juga menyebutkan bahwa pada sel kanker yang parah terjadi supresi pada signaling ROS yang bertujuan untuk melindungi sel dari signal kematian atau apoptosis.

Penghambatan pada sistem antioksidan di sel kanker akan menyebabkan akumulasi ROS yang akan menginduksi terjadinya kematian sel. Akumulasi ROS pada sel yang mengalami transformasi menyebabkan kerusakan oksidatif ke membrane mitokondria dan mengganggu integritas membrane sehingga menyebabkan kematian sel. Hal ini bertentangan dengan peran ROS pada sel normal, dimana induksi untuk akumulasi ROS tidak bisa terjadi karena output ROS basalnya rendah. Perbedaan biokimia antara sel normal dan sel kanker dapat dijadikan sebagai dasar untuk memodulasi ROS seluler sebagai strategi untuk membunuh sel kanker secara selektif (Trachootam *et al.*, 2006).

ROS dapat menstimulasi apoptosis melalui dua cara yaitu (Neuzil *et al.*, 2006):

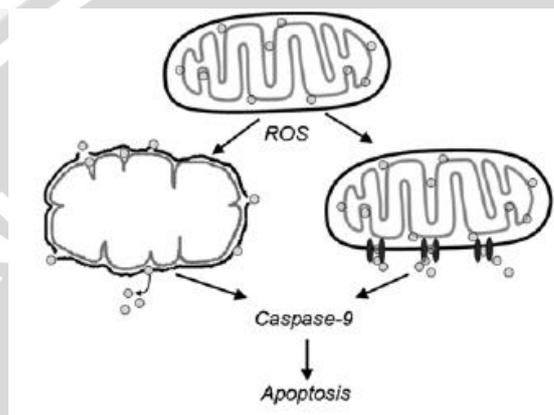
- a. ROS akan dikeluarkan dari mitokondria menuju sitosol. Di sitosol ROS akan mengkatalis pembentukan jembatan disulfide antara monomer Bax dan menyebabkan perubahan conformasi serta dimerisasi yang diikuti dengan perpindahan Bax ke dalam outer membrane mitokondria untuk membentuk channel.
- b. Di mitokondria ROS akan memicu aktivitas oksidasi dari sitokrom c yang memimpin pada modifikasi oksidatif dari cardiolipin yang kemudian akan terjadi pelepasan sitokrom c dari ikatannya menuju fosfolipid mitokondria membrane dalam yang diikuti dengan pelepasan sitokrom c menuju ke sitosol melalui channel mitokondria pada poin a.



Gambar 2.11 Mekanisme ROS dalam menginduksi pelepasan sitokrom c (Neuzil *et al.*, 2006)

Sitokrom c merupakan molekul apoptogenik yang dilepas dari mitokondria (Rerole *et al.*, 2010). Sitokrom c akan dilepas ke sitosol akan berinteraksi dengan

Apaf-1 (*Apoptotic protease activation factor-1*) untuk membentuk apoptosom yang akan mengaktivasi pro-caspase9 menjadi caspase-9 dan caspase-9 akan mengaktivasi caspase-3 dan pada akhirnya akan terjadi apoptosis (Rerole *et al.*, 2010 ; Ghobrial *et al.*, 2005 ; Lanneau *et al.*, 2008 ; Szeto, 2006).



Gambar 2.12 Peran ROS pada apoptosis (Szeto, 2006)

2.6.2 Hubungan ROS dan p53

p53 merupakan protein penghambat tumor dan merupakan modulator pusat dari apoptosis. p53 dapat menginduksi apoptosis melalui jalur yang tergantung pada produksi ROS. Ekspresi yang berlebih dari p53 dapat menginduksi apoptosis melalui produksi ROS (Johnson *et al.*, 1996).

ROS juga bisa berperan sebagai sinyal yang memicu aktivasi p53 dan sebagai faktor yang memediasi apoptosis (Liu *et al.*, 2009). p53 dapat menginduksi apoptosis melalui 3 proses yaitu menginduksi transkripsi dari gen yang redox, memproduksi ROS dan mendegradasi komponen mitokondria (Polyak *et al.*, 1997). p53 juga menyebabkan permeabilisasi membran luar mitokondria yang menyebabkan translokasi Bax. Bax juga merupakan salah satu

keluarga pro apoptogenik yang menjadi target dari p53 (Schuler dan Green, 2001).

Jalur apoptosis dari p53 termasuk jalur apoptosis dependent caspase dengan cara salah satunya adalah dengan meningkatkan produksi ROS yang diikuti dengan peningkatan membran potensial dari mitokondria. Jalur apoptosis p53 dependent caspase melalui peningkatan produksi ROS tidak melibatkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria hal ini disebabkan karena tidak adanya translokasi Bax ke mitokondria dan atau inaktivasi dari Bid (Li *et al.*, 1999). Namun hal ini bertentangan dengan pernyataan Neuzil *et al* (2006) yang menyebutkan bahwa produksi ROS akan menyebabkan translokasi Bax ke mitokondria dan akan menyebabkan pelepasan sitokrom c. Pernyataan ini juga didukung oleh Schuler dan Green (2001) yang menyebutkan bahwa mekanisme aktivasi caspase oleh p53 terjadi karena adanya pelepasan faktor apoptogenik dari mitokondria salah satunya adalah sitokrom c.