



**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5-FU DAN CAIRAN COELOEMIC
CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*) TERHADAP PERSENTASE KALSIMUM
INTRASELULER DAN FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PADA SEL LINE HT-29
KANKER KOLEREKTAL**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

Yeni Purnamasari

146070122011006

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018



HALAMAN PERSETUJUAN

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5-FU DAN CAIRAN COELOEMIC
CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*) TERHADAP JUMLAH KALSIMUM
INTRASELULER DAN FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PADA SEL LINE HT-29
KANKER KOLOREKTAL**

Oleh:

Yeni Purnamasari

146070122011006

Menyetujui

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D

NIP. 196908191998022001

Sofy Permana, Drs.,M.Sc.,D.Sc

NIP. 196809301994021003



RINGKASAN

Yeni Purnamasari, NIM.146070122011006. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 16 Januari 2018. Pengaruh Pemberian Kombinasi 5-FU dan Cairan *Coelomic* Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap Jumlah Kalsium Intraseluler dan *Focal Adhesion Kinase* (FAK) pada Sel Line HT-29 Kanker Kolon. Komisi Pembimbing Ketua: Agustina Tri Endharti, S. Si, PhD. Anggota: Drs. Sofy Permana, MSc., DSc.

Kanker kolorektal adalah suatu keganasan yang berasal dari sel epitel mukosa kolon, dapat terjadi pada hampir semua bagian kolon, yaitu mulai dari sekum sampai rektum. Lebih dari 15% dari kanker kolorektal memiliki pola hereditas, dan riwayat keluarga merupakan faktor resiko paling kuat terhadap perkembangan kanker kolorektal. Dalam banyak hal, salah satu terapi untuk kanker kolorektal stadium lanjut adalah dengan melakukan kemoterapi. Obat-obatan kemoterapi yang saat ini digunakan sebagai terapi adjuvan pada pasien kanker kolon antara lain 5-fluorouracil (5-FU) dan leucovorin (LV), *fluoropyrimidine*, dan kombinasi regimen dengan *Irinotecan* atau Oxaliplatin. 5-Fluoro Uracil (5-FU) merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon. 5-FU adalah antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim timidilat sintetase (TS). Namun, efektivitas dari 5-FU untuk terapi tunggal hanya sebesar 15% dan meningkat menjadi 40-50% jika dikombinasi dengan regimen baru lain seperti *Irinotecan* dan Oxiplatin.

Baru-baru ini banyak penelitian mengenai manfaat penggunaan cacing tanah sebagai obat. Hal itu dijelaskan bahwa didalam cacing tanah mengandung *coelomic fluid* (CF) yang terdiri atas zat-zat biologi seperti lektin, polisakarida, protease, peptida antibakteri, enzim metallo, enzim fibrinolitik, dan lain-lain. Salah satu protein yang terkandung di dalam *coelomic fluid* adalah *coelomic cytolytic factor-1* (CCF-1). CCF-1 dilaporkan memiliki *coelomic cytolytic factor-1* (CCF-1) dengan berat 42 KDa dilaporkan memiliki peran dalam sitolitik, opsonisasi, dan hemolitik. Pada penelitian yang dilakukan oleh Bilej *et al* (2015) menyebutkan bahwa CCF-1 merupakan analog dari TNF. Hal ini dibuktikan dengan pemberian *coelomic fluid Eisenia fetida* pada sel line L929 memiliki aktifitas litik yang sensitif terhadap *Tumor Necrosis Factor* (TNF).

Pada kanker, protein *Focal Adhesion Kinase* (FAK) diekspresikan berlebih sehingga bertindak sebagai onkogen. Peningkatan FAK akan menyebabkan ikatan mdm2-p53 sehingga memicu degradasi dari p53 dan mengaktifkan sinyal transduksi P13K-AKT yang akan menghambat caspase-3 dalam menginduksi apoptosis. Pada kanker kolon terjadi perubahan ekspresi dan jumlah dari Ca^{2+} *channel* dan *pumps*, salah satu nya adalah IP_3R dan SERCA. Perubahan tersebut akan menyebabkan terjadinya peningkatan Ca^{2+} di sitoplasma. Peningkatan Ca^{2+} intraseluler akan memicu aktivasi NFAT di nukleus dalam menginduksi ekspresi *cyclin D₁*, kemudian terjadi proliferasi sel. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek cairan *coeloemic* dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai kombinasi 5-FU dalam



menurunkan jumlah Kalsium intraseluler dan *Focal Adhesion Kinase* (FAK) pada sel kanker kolorektal HT-29.

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental sebenarnya (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* dengan *Post Test Only Controlled Group Design* pada kultur sel kanker kolorektal HT-29. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 24 kelompok yang terbagi dalam 6 kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri dari 4 ulangan sampel. Keenam kelompok tersebut adalah Kelompok kontrol negatif yaitu sel HT-29 yang tidak diberikan perlakuan, kelompok kontrol positif yaitu sel HT-29 yang diberikan 5-FU dosis 5 μ g/ml, kelompok perlakuan I yaitu sel HT-29 yang diberikan 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 5 μ g/ml, kelompok perlakuan II yaitu sel HT-29 yang diberikan 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 10 μ g/ml, kelompok perlakuan III yaitu sel HT-29 yang diberikan 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml, dan kelompok perlakuan IV yaitu sel HT-29 yang diberikan *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml. Pengambilan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dilakukan dengan cara *heat and cold-shock*. Pemberian 5-FU dan *coelomic fluid* dilakukan setelah kultur sel mencapai konfluensi 80%, kemudian diinkubasi selama 24 jam sebelum dilakukan pewarnaan flowsitometri menggunakan antibodi FAK dan pemeriksaan kalsium intraseluler dengan imunofluoresen menggunakan Fluo-3 AM.

Berdasarkan hasil uji statistik One-Way ANOVA yang dilakukan pada penelitian ini, terbukti bahwa pemberian *coelomic fluid Lumbricus rubellus* sebagai kombinasi 5-FU dapat menurunkan jumlah kalsium intraseluler ($p=0.00$) dan protein FAK ($p=0.00$) pada sel HT-29 kanker kolorektal. Pada penelitian ini juga dibuktikan bahwa pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml lebih baik dibandingkan hanya pemberian 5-FU dosis 5 μ g/ml atau *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml saja. Penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian *coelomic fluid Lumbricus rubellus* sebagai terapi kombinasi 5-FU dapat menurunkan jumlah kalsium intraseluler dan FAK pada sel HT-29 secara signifikan. Sehingga diharapkan, penelitian ini dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah khasanah konsep dasar tentang peran *coelomic fluid* sebagai terapi kombinasi untuk 5-FU dalam kanker kolorektal.



SUMMARY

Yeni Purnamasari, NIM.146070122011006. Program in Biomedical Science Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang, January 19st 2018. The Effect of Combination of 5-FU and Coelomic Soil Earthworm (*Lumbricus rubellus*) on the Amount of Intracellular Calcium and Focal Adhesion Kinase (FAK) in Colorectal Cancer Cell Line HT-29. Advisory Committee Lead: Agustina Tri Endharti, S. Si, PhD. Member : Drs. Sofy Permana, MSc., DSc.

Colorectal cancer is a malignancy derived from colonic mucosal epithelial cells, can occur in almost all parts of the colon, ranging from cecum to rectum. More than 15% of colorectal cancers have a hereditary pattern, and family history is the strongest risk factor for the development of colorectal cancer. This suggests that the incidence of colorectal cancer is very high, as well as the death rate. In many ways, one of the therapies for advanced colorectal cancer is to do chemotherapy. Chemotherapy drugs currently used as adjuvant therapy in colon cancer patients include 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV), fluoropyrimidine, and a combination of regimens with Irinotecan or Oxaliplatin. 5-Fluoro Uracil (5-FU) is the main chemotherapeutic agent used for colon cancer therapy. 5-FU is an antimetabolite that acts antagonistically with thymine against the activity of thymidylate synthase (TS) enzyme. However, the effectiveness of 5-FU for single therapy was only 15% and increased to 40-50% when combined with other new regimens such as Irinotecan and Oxiplatin.

Recently a lot of researches are conducted on the benefits of using earthworms as a medicine. It is explained that inside earthworms contain coelomic fluid (CF) consisting of biological substances such as lectin, polysaccharide, protease, antibacterial peptide, metallo enzyme, fibrinolytic enzyme, and others. One of the proteins contained in coelomic fluid is coelomic cytolytic factor-1 (CCF-1). CCF-1 reportedly has coelomic cytolytic factor-1 (CCF-1) with molecular of 42 KDa is reported to have a role in cytolytic, opsonization, and hemolytic. In a study conducted by Bilej et al (2015) mentioned that CCF-1 is an analogue of TNF. This is evidenced by the provision of coelomic fluid *Eisenia fetida* on cell line L929 has sensitive lytic activity against Tumor Necrosis Factor (TNF).

The protein Focal Adhesion Kinase (FAK) is overexpressed in cancer to act as an oncogene. Increased FAK will cause the mdm2-p53 bond to trigger degradation of p53 and activate the P13K-AKT transduction signal which will inhibit caspase-3 in inducing apoptosis. In colon cancer, changes in expression and number of Ca²⁺ channels and pumps, one of which is IP3R and SERCA. These changes will cause an increase in Ca²⁺ in the cytoplasm. Increased intracellular Ca²⁺ will trigger NFAT activation in the nucleus in inducing cyclin D1 expression then cell proliferation occurs. The aim of this study was to determine the effect of coelomic fluid from *Lumbricus rubellus* earthworm as a 5-FU combination in decreasing intracellular calcium and Focal Adhesion Kinase (FAK) in HT-29 colorectal cancer cells.



This study used an experimental design actually (true experimental design) in the laboratory in vitro with Post Test Only Controlled Group Design on HT-29 colorectal cancer cell culture. This study used a sample of 24 groups divided into 6 treatment groups, each group consisting of 4 replicates of the sample. The six groups were negative control group ie untreated HT-29 cells, positive control group ie HT-29 cells given 5-FU dose 5µg/ml, treatment group I ie HT-29 cells given 5-FU dose 5µg / ml and coelomic fluid dose 5 µg/ml, treatment group II ie HT-29 cells given 5-FU dose 5µg/ml and coelomic fluid dose 10 µg/ml, treatment group III ie HT-29 cells given 5-FU dose 5 µg/ml and coelomic fluid doses of 20 µg/ml, and the IV treatment group of HT-29 cells given coelomic fluid dose of 20µg/ml. Coelomic fluid removal *Lumbricus rubellus* is done by heat and cold-shock. Giving of 5-FU and coelomic fluid was done after cell culture reached 80% confluence, then incubated for 24 hours before flowcytometric staining using FAK antibody and intracellular calcium examination with immunofluorescent using Fluo-3 AM.

Based on ANOVA One-Way statistical test conducted in this research, it is proven that giving *Lumbricus rubellus* coelomic fluid as a 5-FU combination can decrease intracellular calcium ($p = 0.00$) and FAK ($p = 0.00$) protein on HT-29 cancer cells colorectal. In this study also proved that the combination of 5-FU and coelomic fluid doses of 20 µg/ml is better than the 5-FU dose of 5 µg / ml or coelomic fluid dose of 20 µg/ml. The study concluded that coelomic fluid administration of *Lumbricus rubellus* as a 5-FU combination therapy can significantly decrease intracellular calcium and FAK in HT-29 cells. It is expected this research can serve as a theoretical basis to add to the basic concept of the role of coelomic fluid as a combination therapy for 5-FU in colorectal cancer.



DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Masalah Penelitian.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kanker Kolon.....	6
2.1.1 Definisi dan Epidemiologi Kanker Kolon.....	6
2.1.2 Etiologi dan Faktor Resiko.....	7
2.1.3 Patologi dan Staging Kanker Kolorektal.....	9
2.1.4 Sel Line HT-29.....	11
2.2 5-Fluourasil (5-FU).....	12
2.2.1 Mekanisme Kerjai dari 5-FU.....	12
2.2.2 Penghambatan <i>Thymidylate Synthetase</i> (TS).....	14
2.3 <i>Coelomic Fluid</i> Cacing Tanah.....	16
2.3.1 Cacing Tanah <i>Lumbricus rubellus</i>	16



2.3.2	<i>Coelomic Fluid</i> pada Cacing Tanah.....	16
2.3.3	<i>Coelomic Fluid Factor (CCF)</i> sebagai analog dari TNF.....	18
2.3.4	Peran TNF.....	19
2.3.5	TNF sebagai agen anti-kanker.....	20
2.4	Kalsium.....	22
2.4.1	Peran Kalsium.....	22
2.4.2	Sinyal Kalsium Intraselular.....	25
2.4.3	Perubahan Saluran dan Pompa Ca^{2+} pada Kanker.....	27
2.5	<i>Focal Adhesion Kinase (FAK)</i>	30
2.5.1	<i>Fungsi Focal Adhesion Kinase (FAK)</i>	31
2.5.2	Fungsi FAK pada Sel Kanker.....	34
2.5.2.1	Gen Amplifikasi FAK.....	34
2.5.2.2	Peran FAK pada Kelangsungan Hidup dan Proliferasi Sel Kanker.....	34
2.5.2.3	FAK menyebabkan Metastasis Kanker.....	36
2.5.2.4	FAK pada <i>Stem Cell</i> Kanker.....	36
2.5.3	FAK menjadi Target Terapi.....	37

BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS

3.1	Kerangka Konsep.....	38
3.1.1	Penjelasan Kerangka Konsep.....	39
3.2	Hipotesis.....	41

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Desain Penelitian.....	42
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian.....	42
4.2.1	Waktu Penelitian.....	42
4.2.2	Tempat Penelitian.....	42
4.3	Sampel Penelitian.....	42
4.3.1	Sampel.....	42
4.3.2	Jumlah Sampel dan Pengulangan.....	43
4.4	Variabel Penelitian.....	44
4.4.1	Variabel Bebas.....	44



4.4.2	Variabel Terikat.....	44
4.5	Definisi Operasional.....	44
4.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	45
4.7	Prosedur Penelitian.....	46
4.7.1	Kultur Sel HT-29.....	46
4.7.2	Prosedur Panen Subkultur Sel HT-29.....	49
4.7.3	Pengambilan <i>coelomic fluid Lumbricus rubellus</i> dengan cara <i>heat and cold-shock</i>	51
4.7.4	Prosedur Perlakuan.....	52
4.7.5	Pengukuran <i>Focal Adhesion Kinase (FAK)</i> menggunakan Flowsitometri.....	54
4.7.6	Pengukuran Kalsium Intraseluler menggunakan Imunofluoresen.....	55
4.8	Pengolahan dan Analisa Data.....	55
4.9	Bagan Alur Penelitian.....	56

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1	Efek <i>Coelomic Fluid Lumbricus rubellus</i> terhadap persentase jumlah protein FAK pada sel HT-29.....	57
5.2	Efek <i>Coelomic Fluid Lumbricus rubellus</i> terhadap persentase jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29.....	61
5.3	Hasil Uji Korelasi Pearson.....	65

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1	Efek <i>Coelomic Fluid Lumbricus rubellus</i> terhadap persentase jumlah protein FAK pada sel HT-29.....	66
6.2	Efek <i>Coelomic Fluid Lumbricus rubellus</i> terhadap persentase jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29.....	71
6.3	Korelasi antara <i>Focal Adhesion Kinase</i> dengan Ca^{2+} intraseluler.....	74
6.4	Keunggulan dan Keterbatasan Penelitian.....	74



BAB 7 PEMBAHASAN

7.1 Kesimpulan.....

76

7.2 Saran.....

76

DAFTAR PUSTAKA.....

78

LAMPIRAN.....

86



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Klasifikasi berdasarkan sub tipe kanker kolorektal.....	9
Tabel 2.2	Klasifikasi Kanker Kolorektal berdasarkan	
	TNM (Tumor/Nodes/Metastases) System.....	10
Tabel 2.3	Tabel Overekspresi FAK pada kanker.....	31



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	Metabolisme 5-fluourasil.....	13
Gambar 2.2	Mekanisme penghambatan TS oleh 5-fluourasil.....	15
Gambar 2.3	Cacing Tanah <i>Lumbricus rubellus</i>	16
Gambar 2.4	TNF signaling pathway.....	20
Gambar 2.5	Gelombang Ca ²⁺ mengaktifkan faktor transkripsi NFAT yang mengontrol siklus sel.....	24
Gambar 2.6	Peran penting Ca ²⁺ channels, pumps dan transportes pada sel kanker.....	27
Gambar 2.7	Mekanisme obat dalam menghambat influx Ca ²⁺	29
Gambar 2.8	Jalur Sinyal FAK pada kanker.....	33
Gambar 2.9	Skema struktur FAK.....	34
Gambar 2.10	Sinyal transduksi FAK pada perkembangan sel kanker dan tumor.....	36
Gambar 4.1	Prosedur Kultur Sel HT-29.....	48
Gambar 4.2	Proses Panen Subkultur Sel HT-29.....	50
Gambar 4.3	Pengambilan <i>Coelomic Fluid Lumbricus rubellus</i> dengan cara <i>Heat and Cold-shock</i>	52
Gambar 4.4	Pemberian Perlakuan Kelompok.....	53
Gambar 5.1	Hasil pemeriksaan persentase protein FAK sel kanker kolon HT-29 dengan menggunakan Flowsitometri.....	58



Gambar 5.2 Grafik Perbandingan Persentase Jumlah Protein FAK berdasarkan kelompok yang Dipapar dengan 5-FU dan Berbagai Dosis *Coelomic fluid*..... 59

Gambar 5.3 Tampilan Ekspresi Ca^{2+} intraseluler dengan mikroskop Fluoresen..... 62

Gambar 5.4 Grafik Perbandingan Persentase Jumlah Ca^{2+} intraseluler berdasarkan kelompok yang dipapar dengan 5-FU dan Berbagai Dosis *Coelomic Fluid*..... 63



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keterangan Kelaikan Etik.....	86
Lampiran 2	Hasil Uji Statistik.....	87



DAFTAR SINGKATAN

5-FU	: 5-Fuoro Uracil
APAF-1	: Apoptosis protein activating factor-1
APC	: Adenomatosa Polyposis Coli
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Bid	: BCL-2 interacting domain
CaM	: Calmodulin
CaMKII	: calmodulin-dependent protein kinase II
CCF-1	: Coelomic Cytolytic Factor-1
CDK	: Cyclin-dependent kinase
CF	: Coelomic fluid
CH ₂ THF	: 5,10-metilentetrahidrofolat
CR	: Cytokine Receptor
DD	: Death Domain
DIABLO	: direct IAP binding protein with low pI
DHFU	: Dihydrofluorouracil
DPD	: Dyhydropyrimidine dehydrogenase
dNTP	: deoxynucleotide
dTMP	: deoxythymidine monophosphate
dTTP	: deoxythymidine triphosphate
dUMP	: deoxyuridine monophosphate
dUTP	: deoxyuridine triphosphate
ER	: Endoplasma Retikulum
ERK	: extracellular signal- regulated kinase
FADD	: Fas Associated Death Domain
FdUMP	: Fluorodeoxyuridine monophosphate
FdUTP	: Fluorodeoxyuridine triphosphate
FUR	: Fluorouridine
FUTP	: Fluorouridine triphosphate
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FAT	: Focal adhesion targetting
FAP	: Familial Adenoma Polyposis
GFR	: Growth Factor Receptor
GPCR	: G-protein coupled receptor
HNPCC	: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
IAPs	: Protein Inhibitor Apoptosis
IP ₃	: Inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK	: cJun n-terminal kinase
LV	: Leucovorin
MAPK	: Mitogen-activated protein
MEKK1	: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase kinase 1
NFAT	: nuclear factor of activated T-cells
NFKB	: nuclear factor-kb
NLS	: Nuclear Localization Signal
OPRT	: Orate Phosphoribosyltransferase
PRPP	: Phosphoribosyl Pyrophosphate



- PRR : *Proline-Rich Regions*
- PI3K : *Phosphoinositide 3-Kinase*
- RIP : *Receptor interacting protein*
- ROS : *Reactive oxygen species*
- RR : *Ribonucleotida Reductase*
- Smac : *Second mitochondria-derived aktivator of caspase*
- SR : *sarkoplasmik endoplasma*
- TGF- β : *Transforming growth factor- β*
- TK : *Thymidine Kinase*
- TNF : *Tumor Necrosis Factor*
- TRADD : *TNFR-associated death domain*
- TRAF-2 : *TNFR-associated factor 2*
- TS : *Thymidylate Synthase*
- UK : *Uridine Kinase*
- UDG : *urasil DNA glikolsilasi*
- UP : *Uridine Phosphorylase*
- VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
- VEGF-A : *Vascular Endhotelial Growth Factor-A*
- WHO : *World Health Organization*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Setiap tahun dijumpai hampir 6 juta penderita baru yang diketahui mengidap penyakit kanker dan lebih dari 4 juta di antaranya yang meninggal (Risksdas, 2013). Menurut WHO tahun 2014, penyakit kanker kolorektal di Indonesia pada pria menduduki peringkat ke 2, setelah kanker paru yaitu sebesar 15.985 kejadian. Sedangkan pada wanita menduduki peringkat ke 3 setelah kanker payudara dan kanker serviks sebesar 11.787 kejadian. Diperkirakan sekitar 10,2% dari total populasi 247.000.000 pria meninggal akibat kanker kolorektal dan sekitar 8,5 % dari total populasi 247.000 wanita meninggal akibat penyakit tersebut di Indonesia (WHO, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa insiden terjadinya kanker kolorektal sangat tinggi, begitu juga dengan angka kematiannya. Kanker kolorektal adalah suatu keganasan yang berasal dari sel epitel mukosa kolon, dapat terjadi pada hampir semua bagian kolon, yaitu mulai dari sekum sampai rektum. Lebih dari 15% dari kanker kolorektal memiliki pola hereditas, dan riwayat keluarga merupakan faktor resiko paling kuat terhadap perkembangan kanker kolorektal. Kelompok lain yang beresiko tinggi terkena kanker kolorektal adalah pasien dengan *inflammatory bowel disease* (IBD), colitis ulseratif, dan penyakit chron, dan hal ini berperan sebesar 1-2% pada kanker kolorektal di populasi umum. Resiko meningkat lebih lanjut pada usia dini saat diagnosis IBD ditegakkan (Boyle T et al, 2012).

Oleh sebab itu, kanker kolorektal menjadi salah satu masalah global yang serius untuk diselesaikan. Menurut WHO, kanker kolorektal secara histologi dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu adenokarsinoma, adenokarsinoma *mucinous*, dan sel kanker *signet ring*. Pada penelitian ini menggunakan sel HT-29 sebagai model kanker kolon. Sel HT-29 adalah sel adenokarsinoma



kolon manusia yang pernah diisolasi dari tumor primer perempuan Kaukasia berusia 44 tahun pada tahun 1964 oleh Fogh dan Trempe (1975). Salah satu terapi untuk kanker kolorektal adalah dengan melakukan kemoterapi. Berkembangnya kemoterapi dan radioterapi pada saat ini memungkinkan untuk terapi adjuvan penderita stadium lanjut atau pada kejadian kekambuhan. Obat-obatan kemoterapi yang saat ini digunakan sebagai terapi adjuvan pada pasien kanker kolon antara lain 5-fluorouracil (5-FU) dan leucovorin (LV), *fluoropyrimidine*, dan kombinasi regimen dengan *Irinotecan* atau Oxaliplatin. 5-Fluoro Uracil (5-FU) merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon. 5-FU adalah antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim timidilat sintetase (TS) (Backus et al, 2001). Pada sel kanker kolon HCT-15 dan HT-29, 5-FU menunjukkan penghambatan pada fase G2/M. 5-FU akan diubah menjadi tiga bentuk metabolit aktif; *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). Bentuk aktif metabolit tersebut merusak sintesis RNA dan fungsi dari *thymidylate synthase* (TS) (Lim et al., 2007). Namun, efektivitas dari 5-FU untuk terapi tunggal sebesar 10-15% dan meningkat menjadi 40-50% jika dikombinasi dengan regimen baru lain seperti Irinotecan dan Oxiplatin (Longley, 2003). Berdasarkan penjelasan diatas, masih diperlukan terapi kombinasi untuk meningkatkan efektivitas dari 5-FU.

Baru-baru ini banyak penelitian mengenai manfaat penggunaan cacing tanah sebagai obat. Di Cina, cacing tanah (*Eisenia fetida*) digunakan untuk mengobati bronkitis kronik, asma bronkial, psikosis, ulkus di saluran pencernaan, ulkus pepikum, parotis epidemika, herpes zoster, dan kanker (Liu et al, 2004). Hal itu dijelaskan bahwa didalam cacing tanah mengandung *coelomic fluid* (CF) yang terdiri atas zat-zat biologi seperti lektin, polisakarida, protease, peptida antibakteri, enzim metallo, enzim fibrinolitik, dan lain-lain (Hua et al, 2011). Protein *coelomic cytolytic factor-1* (CCF-1) dengan berat 42 KDa dilaporkan memiliki peran sebagai sitotoksik, opsonisasi, dan hemolitik. Protein Lisenin dengan berat molekul 33 kDa yang diisolasi dari *coelomic fluid* cacing tanah *Eisenia foetida* dilaporkan juga mempunyai aktivitas yang sama



dengan CCF-1. *Coelomic fluid* cacing tanah *Eisenia fetida* juga menyebabkan terjadinya apoptosis pada HeLa cell secara invitro. (Yanqin, et al, 2007).

Diharapkan dengan pemberian *coelomic fluid* sebagai terapi tambahan kemoterapi, dapat membantu kerja 5-FU dalam terapi kanker kolorektal. *Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan protein onkogenik yang terletak di sitoplasma dan berperan penting dalam perkembangan dari kanker kolorektal. FAK mengatur perlekatan sel, proliferasi, survival dan motilitas sel. FAK diekspresikan pada kanker stadium lanjut (Yoon, et al. 2015). Oleh sebab itu, FAK dijadikan sebagai potensial target terapi untuk kanker. FAK merupakan protein non reseptor tirosin kinase yang dapat diaktifkan apabila terjadi interaksi dengan integrin, reseptor sitokin, Growth Factor Reseptor dan G Protein- Coupled Reseptor (Yoon et al, 2015). FAK juga terdapat pada sel yang normal, tetapi pada sel kanker FAK mengalami ekspresi yang berlebihan sehingga bertindak sebagai onkogen. FAK yang berikatan dengan Src kompleks (FAK/Src) akan memberikan pengaktifan transduser sinyal PI3K-AKT sehingga akan mengaktifkan NFKB dalam menghambat fungsi kaspase-3, sehingga meningkatkan kemampuan kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel kanker (Tai et al. 2015).

Kalsium Intraseluler atau $[Ca^{2+}]_i$ merupakan *second messenger* yang mengatur berbagai proses seluler seperti proliferasi sel, diferensiasi sel, siklus sel, sintesis ATP dan fertilisasi. Oleh karena itu konsentrasi dari $[Ca^{2+}]_i$ perlu diatur (Santella et al, 2005). Peningkatan konsentrasi dari $[Ca^{2+}]_i$ akan memicu calpain sebagai protease sistein menginduksi pembelahan FAK, sehingga FAK akan terdegradasi dan berperan penting dalam motilitas sel kanker (Sundaramoorthy et al. 2015).

Penelitian ini ditujukan untuk menguji kombinasi cairan *coeloemic* dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU) secara in vitro pada sel kanker kolon HT-29 untuk membuktikan senyawa aktif yang terdapat pada cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* memiliki kemampuan antitumor melalui penghambatan Kalsium intraseluler dan *Focal Adhesion Kinase* (FAK).



1.2 Rumusan Masalah

Apakah kombinasi cairan *coelomic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluourasil (5-FU) dapat menurunkan konsentrasi kalsium intraseluler dan persentase *Focal Adhesion Kinase* (FAK) pada sel HT-29 secara *in vitro*?

Sub Masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah ada hubungan persentase FAK dan konsentrasi kalsium intraseluler pada sel HT-29 yang diberikan kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU).

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU) dapat menurunkan konsentrasi kalsium intraseluler dan persentase *Focal Adhesion Kinase* (FAK) pada sel HT-29 secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan pemberian kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU) dapat menurunkan persentase kalsium intraseluler pada kultur sel kanker kolon HT-29 secara *in vitro*.
2. Untuk membuktikan pemberian kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU) mampu menurunkan persentase FAK sel kanker kolon HT-29 secara *in vitro*.



3. Untuk membuktikan adanya hubungan antara penurunan FAK dan Ca^{2+} intraseluler pada sel kanker kolon HT-29 setelah pemberian kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan 5-Fluoro Urasil (5-FU).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Menambah khasanah ilmu pengetahuan terutama di bidang kesehatan tentang penggunaan cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai kombinasi 5-FU dalam menurunkan konsentrasi kalsium intaseluler dan persentase FAK secara in vitro dari kultur sel kanker kolon HT-29.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai alternatif terapi kombinasi penyakit kanker kolon yang terjangkau.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon

2.1.1 Definisi dan epidemiologi kanker kolon

Perbedaan antara sel kanker dan sel normal bahwa sel kanker tidak akan menunjukkan terjadi proses penuaan atau senescence. Kanker dan penuaan merupakan dua proses yang serupa yang mewakili hasil akhir dari akumulasi waktu dan berbagai disfungsi ireversibel, terutama disebabkan oleh DNA akibat stress dan kerusakan sel. Dalam istilah sederhana, kanker adalah penyakit proliferasi sel yang tidak terkontrol yang terjadi di tempat yang salah pada waktu yang salah, yang disebabkan oleh sinyal onkogenik (Sameer, 2013). Kanker merupakan penyakit tidak menular dan penyebab salah satu kematian di dunia. Setiap tahun kurang lebih sekitar 6 juta penderita baru mengidap kanker dan lebih dari 4 juta diantaranya meninggal.

Hal ini menjadikan kanker sebagai masalah kesehatan utama baik di Indonesia maupun di dunia. Insidens kanker di Indonesia juga meningkat setiap tahunnya, dari 12,7 juta kasus tahun 2008 menjadi 14,1 juta kasus tahun 2012 (WHO, 2014).

Kanker kolon adalah suatu keganasan yang berasal dari sel epitel mukosa kolon, dapat terjadi pada hampir semua bagian kolon, yaitu mulai dari sekum sampai rektum. Kanker kolon dapat disebut juga sebagai kanker kolorektal, tergantung letak dari lesinya (Abu Hassan et al, 2016). Insiden kanker kolorektal menduduki peringkat kedua dengan jumlah 15,985 kejadian setelah kanker paru pada pria dan peringkat ketiga dengan jumlah 11,787 kejadian setelah kanker payudara dan serviks pada wanita. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Kanker payudara, kolorektal, hati, paru dan perut adalah penyakit kanker yang menyebabkan kematian terbanyak setiap tahunnya.. Menurut WHO pada tahun 2014, Indonesia



memiliki jumlah kematian akibat kanker sebesar 1,5 juta dari total 247 juta penduduk.

Kanker tertinggi di Indonesia pada perempuan adalah kanker payudara, kanker leher rahim dan paru. Sedangkan pada laki-laki adalah kanker paru, hati dan kolorektal.

Berdasarkan jenis kelamin penderitanya di Indonesia, kanker kolorektal menempati posisi ketiga pada laki-laki penyebab kematian (10,2%) dan posisi keempat pada wanita (8,5%) (Rikesdas., 2013).

2.1.2 Etiologi dan Faktor Resiko

Faktor lingkungan dan keturunan memiliki peran penting terhadap perkembangan kanker kolorektal. Lebih dari 15% dari kanker kolorektal memiliki pola hereditas, dan riwayat keluarga merupakan faktor risiko paling kuat terhadap perkembangan kanker kolorektal. Risiko selama hidup dari terjadinya kanker kolorektal dua kali lipat pada seseorang yang memiliki keturunan pertama dan meningkat empat kali lipat jika diagnosis ditegakkan sebelum usia 45 tahun (Johns et al, 2001). Polip adalah faktor risiko terjadinya kanker kolorektal, risiko ini meningkat dengan bertambahnya ukuran polip dan pada pemeriksaan histologi ditemukan tipe *villous*. Adenoma berukuran lebih dari 1 cm memiliki risiko sekitar 8% untuk terjadinya kanker kolorektal selama periode 10 tahun lagi (Stryker, 1987). Pengaruh dari faktor makanan masih menjadi kontroversial. Makanan yang rendah serat dan sayuran atau makanan tinggi lemak dan daging merah, konsumsi alkohol berlebih dan obesitas mungkin menjadi faktor risiko terjadinya kanker kolorektal (Chan, 2010). Rokok dikaitkan dengan terjadinya adenoma dan faktor risiko kanker kolon. Faktor yang memiliki efek protektif terhadap risiko kanker kolon adalah asupan serat makanan, buah-buahan, sayur-sayuran, ikan, aktivitas fisik dan aspirin (Bosetti et al, 2012). Kelompok lain yang berisiko tinggi terkena kanker kolorektal adalah pasien dengan *inflammatory bowel disease* (IBD), kolitis ulseratif, dan penyakit kronis, kelompok



tersebut berperan sebesar 1-2% pada terjadinya kanker kolorektal di populasi umum.

Resiko meningkat lebih lanjut pada usia dini saat diagnosis IBD ditegakkan, durasi dari gejala dan tingkat keparahan peradangan (Boyle T et al, 2012).

Sindrom kanker kolorektal yang paling dikenal adalah sindrom Lynch, juga disebut kanker kolorektal herediter non-poliposis (HNPCC), dan polyposis adenoma familial (FAP), keduanya diturunkan secara autosomal. Sindrom Lynch berperan 1-3% dari semua kasus kanker kolorektal dan disebabkan mutasi DNA pada MLH1, MSH2, MSH6 dan PMS2. Kanker kolorektal pada sindrom Lynch terjadi pada usia rata-rata 45 tahun dan dapat meningkatkan resiko menjadi ganas di luar organ kolon.

FAP terjadi kurang dari 1% dari semua kanker kolorektal dan terjadi akibat mutasi gen *adenomatosa polyposis coli* (APC) pada kromosom 5 (Lynch, 2003).

Mutasi dari APC dihubungkan dengan β -catenin di sitoplasma yang bertranslokasi ke nukleus dan membentuk kompleks dengan *T cell factor* (Tcf). Aktivasi β -catenin akan menginduksi gen target, termasuk c-Myc dan cyclin D1 (Avvisato et al, 2007). Peningkatan protein cyclin D1 terjadi pada adenokarsinoma dan polip adenomatosa dari kolon. Gen cyclin D1 tidak dihasilkan di kanker kolon tetepi di ekspresikan berlebih pada kanker kolon, hipotesis ini berdasarkan bahwa pensinyalan onkogenik menginduksi cyclin D1 berlimpah, sehingga berkontribusi pada fenotip tumor kanker kolon. Cyclin D1 memicu perkembangan *cell cycle* fase G₁ pada sel kultur. Selain itu, cyclin D berperan penting dalam transisi fase G₁ melalui fungsi *kinase-independent* dengan menghambat p21 (Alao, 2007).



2.1.3 Patologi dan Staging Kanker Kolorektal

Menurut WHO, kanker kolorektal secara histologi dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu adenokarsinoma, adenokarsinoma mucinous, dan sel kanker signet ring (tabel 2.1).

Tabel 2.1 Klasifikasi berdasarkan sub tipe kanker kolorektal

Adenokarsinoma
<i>Mucinous</i> adenokarsinoma (> 50% mucinous)
<i>Signet-ring</i> sel karsinoma (>50% signet-ring sel)
Sel karsinoma skuamosa
Sel karsinoma kecil
Karsinoma medulari
Karsinoma undiferensiasi
Dan lainnya

Keterangan : dikutip dari Swanson *et al.*, 2003.

Kanker kolorektal diklasifikasikan menurut sistem *staging tumour-lymph node-metastasis* (TNM). Sistem staging ini menyediakan informasi mengenai pertumbuhan infiltratif dari tumor primer, penyebaran di region limponodi atau jarak organ lain (Tabel 2.2).



**Tabel 2.2 Klasifikasi Kanker kolorektal berdasarkan TNM
(Tumors/Nodes/Metastases) system**

Stage	T	N	M
I	T1-2	0	0
IIA	T3	0	0
IIB	T4	0	0
IIIA	T1-2	1	0
IIIB	T3-4	1	0
IIIC	Any	N2	0
IV	Any	Any	1

Tx	Tumor primer tidak dapat dievaluasi
Tis	Karcinoma in situ
T1	Tumor invasi ke submukosa
T2	Tumor invasi ke muskularis propria
T3	Tumor invasi melalui muskularis propria ke subserosa atau ke perikolon non peritoneal atau jaringan perirectal
T4	Tumor invasi langsung ke organ lain atau struktur lain dan/atau perforasi ke organ peritoneum
T4a	Perforasi ke organ peritoneum
T4b	Invasi langsung ke organ atau struktur lain

Nx	Limfonodi regional tidak dapat dievaluasi
N0	Tidak ditemukan metastasis regional limfonodi
N1a	Metastasis pada regional 1 limfonodi
N1b	Metastasis pada regional 2-3 limfonodi
N1c	Satelit pada subserosa, tanpa regional limfonodi
N2	Metastasis di 4 atau lebih regional limfonodi
N2a	Metastasis di 4-6 limfonodi
N2b	Metastasis di 7 atau lebih limfonodi

M0	Tidak didapatkan metastasis jauh
M1a	Metastasis jauh pada satu organ
M1b	Metastasis jauh lebih dari satu organ atau peritoneum

Keterangan : T: tumor; N: nodul; M: metastasis (American Joint Committee on Cancer 2009).

Sistem *staging* TNM memberikan informasi mengenai prognosis dan memfasilitasi dalam mengambil keputusan tindakan terapi (American Joint Committee on Cancer 2009). Untuk mendeteksi adanya metastasis setidaknya perlu memeriksa 12 jumlah kelenjar getah bening (Swanson et al, 2003).



2.1.4 Sel Line HT-29

Sel HT-29 adalah sel adenokarsinoma kolon manusia yang pernah diisolasi dari tumor primer perempuan Kaukasia berusia 44 tahun pada tahun 1964 oleh Fogh dan Trempe (1975). Sel HT-29 berasal dari pasien kanker kolorektal tipe adenokarsinoma *staging* Dukes C. *Staging* Dukes digunakan pada penggolongan kanker kolorektal berdasarkan tumor primer dan penyebarannya. *Stage Dukes C* artinya kanker telah bemetastase ke satu kelenjar getah bening yang dekat dengan kolon (NCC, 2011). Sel-sel ini menarik perhatian karena fakta bahwa sel HT-29 mampu mengekspresikan karakteristik sel-sel usus matang seperti produksi enterosit atau sel lendir. Sel HT-29 ini dapat dimodulasi untuk mengekspresikan jalur diferensiasi enterocyte yang berbeda sehingga sel HT-29 dianggap pluripotent sebagai sel line kolon yang dapat digunakan untuk studi tentang struktur dan molekul yang terlibat dalam diferensiasi sel (Verhoeckx *et al.*, 2015). Seperti pada model sel kanker lainnya, signifikansi perbedaan antara ekspresi gen dan enzim metabolik dari normal sel usus manusia dapat mempengaruhi kesesuaian model dalam merefleksikan permeabilitas secara *in vivo* (Langerholc *et al.*, 2011). Ekspresi protein yang sama juga ditemukan pada sel HT-29 dan morfologi nya sesuai dengan karakteristik dari epitel usus manusia secara *in vivo* (Lenaert *et al.*, 2007). Sel HT-29 telah banyak digunakan untuk menilai efek potensi sebagai antikanker dari berbagai senyawa makanan berdasarkan asal sel karsinoma ini. Contohnya ditemukan pada penelitian tentang aktivitas anti proliferaatif dari dinding organ pencernaan ikan teripang secara *invitro* (Perez-Vega *et al.*, 2013). Ditemukan pada penelitian lain mengetahui aktivitas sitotoksik berbagai jenis ekstrak tomat "*Racimo*" dan merangsang saluran pencernaan melawan pertumbuhan dari sel HT-29 (Guil-Guerrero *et al.*, 2011).



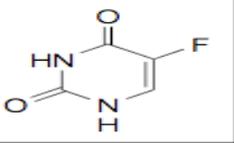
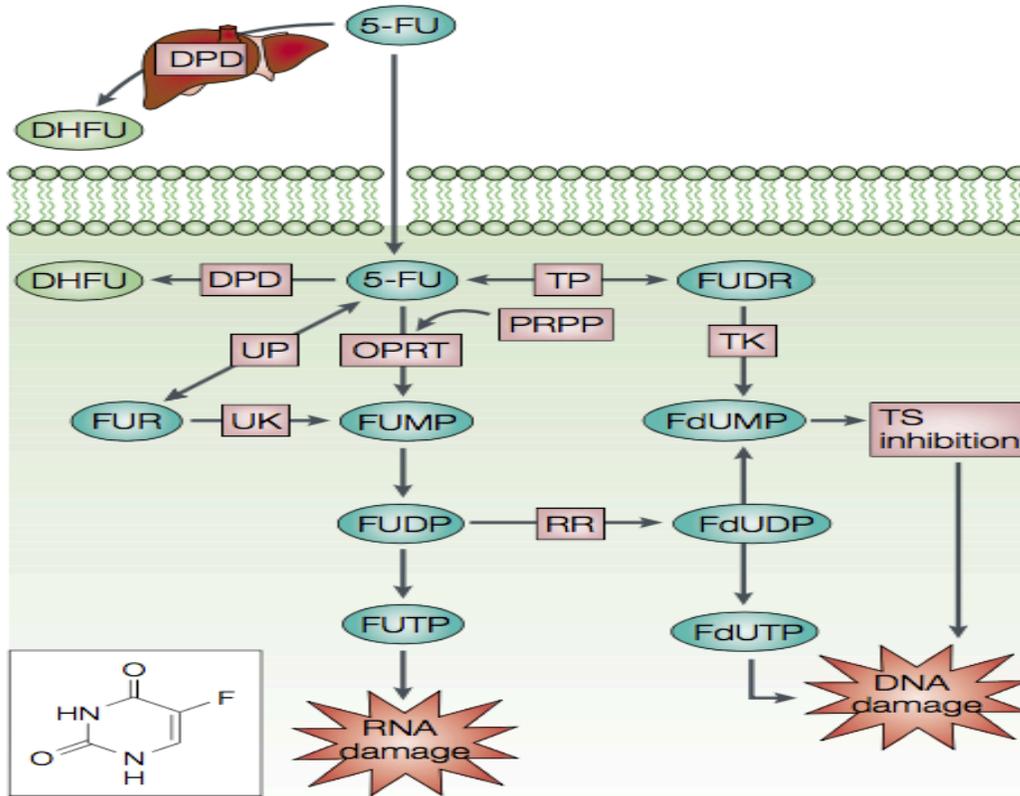
2.2 5-Fluorouracil (5-FU)

5-fluorouracil (5-Fu) merupakan obat yang digunakan untuk tatalaksana kanker. 5-fluorouracil (5-Fu) yang termasuk dalam agen *fluorouracil* digunakan pada kasus kanker payudara, kanker rahim, dan kanker kolon yang telah menyebar ke kelenjar getah bening atau organ jauh, yaitu pada stadium III dan stadium IV (Stocken et al. 2011). 5-Fluoro Uracil (5-FU) merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon di seluruh dunia, baik sendiri atau dalam kombinasi dengan agen kemoterapi lainnya (Longley et al, 2003). Meskipun 5-FU dalam kombinasi dengan agen kemoterapi lainnya meningkatkan tingkat respon dan kelangsungan hidup pada kanker payudara dan kanker kepala dan leher rahim, pada kanker kolorektal, 5-FU memiliki efek terbesar. Kemoterapi berdasarkan 5-FU meningkatkan angka harapan hidup pada pasien dengan kanker kolorektal stadium III. Meskipun demikian, tingkat respon kemoterapi menggunakan 5-FU sebagai pengobatan lini pertama untuk kanker kolorektal stadium lanjut hanya 10-15% (Johnston et al, 2001).

2.2.1 Mekanisme Kerja dari 5-FU

5-fluorouracil (5-FU) sebagai obat anti-metabolit yang bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis atau dengan masuk kedalam makro molekul seperti DNA dan RNA, dan menghambat sintesis nukleotida enzim *thymidylate synthase* (TS) (Longley et al. 2003). 5-FU bekerja pada saat siklus sel terjadi, dengan membatasi ketersediaan dari timidilat (Zhang et al, 2008). 5-FU didalam sel dipecah menjadi tiga bentuk metabolit aktif; *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). Bentuk aktif metabolit tersebut merusak sintesis RNA dan fungsi dari *thymidylate synthase* (TS). Enzim yang mengatur katabolisme 5-FU adalah *dihydropyrimidine*

dehydrogenase (DPD), yang mengubah 5-FU menjadi dihidrofluorouracil (DHFU) yang tidak aktif. DHFU adalah *rate-limiting step* katabolisme 5-FU pada sel normal dan sel tumor, dan proporsi dari pengrusakan menjadi metabolit tidak aktif mencapai 80% (Longley et al, 2003).



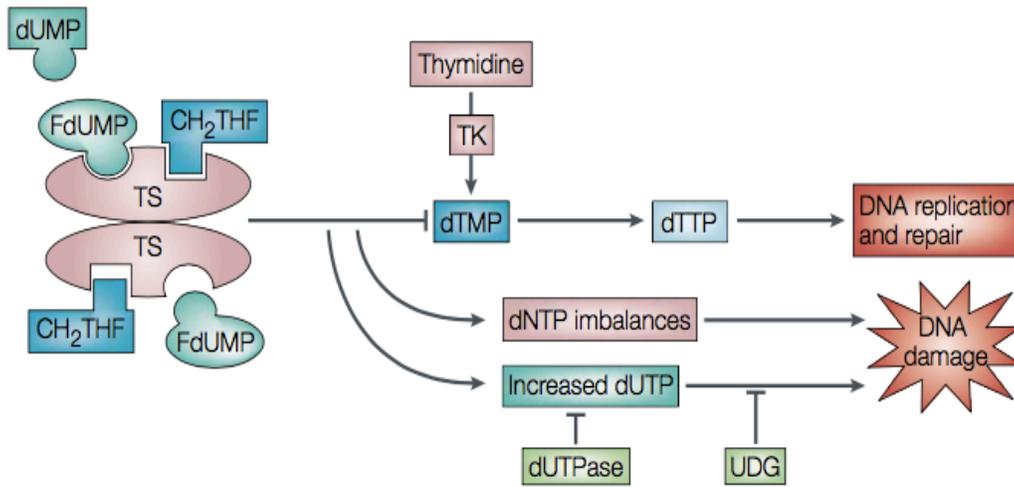
Gambar 2.1 Metabolisme 5-fluorasil. 5-FU diubah menjadi 3 bentuk aktif metabolit; FdUMP, FdUTP, FUTP. Mekanisme utama dari aktivasi 5-FU adalah mengkonversi menjadi fluorodeoxyuridine monophosphate (FUMP), baik secara langsung melalui *orate phosphoribosyltransferase* (OPRT) dengan *phosphoribosyl pyrophosphate* (PRPP) sebagai kofaktor, atau secara tidak langsung oleh *fluorouridine* (FUR) melalui aksi dari *uridine phosphorylase* (UP) dan *uridine kinase* (UK). FUMP difosforilase menjadi *fluorouridine diphosphate* (FUDP). Yang kemudian difosforilase menjadi *fluorouridine triphosphate* (FUTP), atau dikonversi menjadi *fluorodeoxyuridine diphosphate* (FdUDP) oleh ribonukleotida reduktase (RR). Di sisi lain, FdUDP dapat difosforilasi atau didefosforilasi menjadi metabolit aktif, *flupdeoxyuridine triphosphate* (fdUTP) dan *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP). Jalur aktivasi alternatif lainnya melibatkan timin fosforilase yang mnegkatalisis konversi 5-FU melalui *fluorodeoxyuridine* (FUDR), kemudia di fosforilase oleh *thymidine kinase* (TK) menjadi FdUMP. DPD memediasi konversi 5-FU menjadi DHFU (Longley et al. 2003).



2.2.2 Penghambatan *thymidylate synthetase* (TS)

Thymidylate Synthetase (TS) adalah enzim yang diperlukan dalam sintesis basa penyusun DNA. Pada sel kanker, TS diekspresikan tinggi pada fase G1 melalui perantara aktivitas transkripsi dari E2F. TS mengkatalisis metilasi reduksi *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) menjadi *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) dengan pengurangan folat 5,10-metilentetrahidrofolat (CH_2THF) sebagai donor metil. Reaksi ini memberikan satu-satunya sumber *thymidylate de novo*, yang diperlukan untuk replikasi dan perbaikan DNA. Protein TS 36-kDa berfungsi sebagai dimer, kedua subunitnya terdapat tempat pengikat nukleotida dan tempat pengikatan untuk CH_2THF . 5-FU metabolit FdUMP berikatan terhadap tempat pengikatan nukleotida TS, membentuk kompleks terner yang stabil dengan enzim dan CH_2THF , sehingga menghambat pengikatan substrat normal dUMP dan menghambat sintesis dTMP (Longley et al. 2003).

Deplesi dTMP menyebabkan deplesi *deoxythymidine triphosphate* (dTTP), yang menginduksi gangguan pada tingkat *deoxynucleotides* lainnya (dATP, dGTP dan dCTP) melalui berbagai mekanisme umpan balik. Ketidakseimbangan ketersediaan deoksinukleotida (khususnya, rasio dATP/ dTTP) diperkirakan mengganggu sintesis dan perbaikan DNA, yang mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA. Selain itu, penghambatan TS mengakibatkan akumulasi dUMP, yang selanjutnya dapat menyebabkan peningkatan kadar *deoxyuridine triphosphate* (dUTP). 5-FU metabolit FdUTP dan dUTP dapat disalah artikan menjadi DNA. Perbaikan dari urasil dan enzim *uracil-DNA glikosilase* (UDG) akan sia-sia dengan adanya rasio tinggi (F)dUTP / dTTP. Siklus yang sia-sia dari *miss-korporasi*, eksisi dan perbaikan akan menyebabkan pemecahan untai DNA dan kematian sel (Longley et al. 2003).



Gambar 2.2 Mekanisme penghambatan TS oleh 5-fluourasil. Keterangan: *Thymidylate synthetase* (TS) mengkatalisis konversi *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) menjadi *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) dengan *5,10-methylene tetrahydrofolate* (CH₂THF) sebagai donor metil. 5-FU aktif metabolit FdUMP berikatan dengan tempat pengikatan nukleotida TS dan membentuk kompleks terner stabil dengan TS dan CH₂THF, menghalangi akses dUMP ke tempat pengikatan nukleotida dan menghambat sintesis dTMP. Hal ini menyebabkan ketidakseimbangan dari ketersediaan *deoxynucleotide* (dNTP) dan peningkatan kadar *deoxyuridine triphosphate* (dUTP), yang keduanya menyebabkan kerusakan DNA. Tingkat kerusakan DNA yang disebabkan oleh dUTP bergantung pada tingkat pirofosfatase dUTPase dan urasil DNA glikosilasi (UDG). dTMP dapat diselamatkan dari timidin melalui aksi *thymidine kinase* (TK) (Longley *et al.* 2003).



2.3 Coelomic Fluid dari Cacing Tanah

2.3.1 Cacing tanah *Lumbricus rubellus*



Gambar 2.3 Cacing tanah *Lumbricus rubellus*

Klasifikasi cacing tanah *L. rubellus* menurut Hegner dan Engemann tahun 1968 adalah sebagai berikut :

Dunia : Animalia

Divisi : Vermes

Filum : Annelida

Kelas : Oligochaeta

Ordo : Opisthopora

Famili : Lumbricidae

Genus : *Lumbricus*

Spesies : *Lumbricus rubellus*

2.3.2 Coelomic Fluid pada Cacing Tanah

Salah satu yang ingin dicapai dalam praktik kedokteran pada abad 21 adalah kemoprevensi untuk kanker. Sekarang ini, lebih dari 50% obat-obatan digunakan sebagai *clinical trial* untuk aktivitas anti kanker yang didapatkan dari sumber alam.



Pada beberapa tahun terakhir ini, fokus perhatian meningkat pada evolusi dari sistem imun invertebrata. Salah satu yang menjadi perhatian adalah cacing tanah. Cacing tanah merupakan obat tradisional Cina yang digunakan untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit, termasuk tumor. Di klinik, cacing tanah digunakan untuk pengobatan bronkhitis kronik, asma bronkial, psikosis, ulkus di saluran cerna, ulkus peptikum, parotis epidemika, herpes zoster, urtikaria, luka bakar, batu saluran kencing, dan kanker (Yanqin *et al.* 2007).

Penelitian modern mengenai obat-obatan menyatakan bahwa *coelomic fluid* dari cacing mengandung sejumlah besar unsur bioaktif. Hal ini dijelaskan bahwa *coelomic fluid* (CF) cacing tanah memiliki beberapa fungsi biologis, seperti bakteristatik, proteolitik, sitolitik, dan mitogenik (Dinesh *et al.* 2013). Protein dan peptida pada cacing dapat menghambat berbagai aktivitas biologi (Liu *et al.* 2004).

Beberapa komponen dengan efek sebagai anti tumor ditemukan didalam jaringan tubuh cacing tanah, meliputi G-90, campuran berbagai molekul dengan berat molekul 33 KDa, 40 KDa, 42 KDa, 45 KDa, dan 60 KDa (Hua *et al.* 2011).

Fetidine dengan berat moleku 40 KDa yang dianalisa dari *coelomic fluid* cacing memiliki fungsi sebagai antibakteri, hemolisis, dan hemakoagulasi. Protein *coelomic cytolytic factor-1* (CCF-1) dengan berat 42 KDa dilaporkan memiliki peran dalam sitolitik, opsonisasi, dan hemolitik. *Lumbricin I* yang juga di isolasi dari cacing tanah memiliki efek anti mikroba secara in vitro dalam melawan mikroorganisme spektrum luas tanpa aktifitas hemolitik (Cui *et al.* 2001). Protein Lisenin dengan berat molekul 33 kDa diisolasi dari *coelomic fluid* cacing tanah *Eisenia foetida* dilaporkan juga mempunyai aktivitas terhadap hemolisis, sitolitik, dan kontraksi otot polos secara in vitro dan aktivitas vasopressor dan efek letal secara in vivo. Lisenin berikatan dengan



sphingomyelin (SM) pada membran sel target yang menyebabkan kerusakan lokal membran dari sel (Kobayashi *et al.* 2004).

Coelomic fluid cacing tanah memiliki kandungan aktif biologi molekul dan leukosit yang berperan dalam fagositosis, enkapsulasi, dan granuloma. Beberapa protein dan peptida dengan peran sebagai anti tumor dan anti bakteri telah ditemukan di dalam *coelomic fluid* (Yamaji *et al.*, 2003). Pada penelitian yang dilakukan Yanqin dan teman-teman tahun 2007, menunjukkan bahwa *coelomic fluid* cacing tanah memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa setelah dipaparkan selama 48 jam. Hal ini juga dibenarkan oleh penelitian Hua Z, *et al.* (2011) yang menyebutkan bahwa *coelomic fluid* memiliki peran sebagai anti tumor, hal ini ditunjukkan dengan adanya pemberian *coelomic fluid* berbeda konsentrasi pada sel HeLa dan sel LTPF-A2 memiliki hasil yang signifikan sebagai anti-tumor dengan cara menghambat proliferasi dari sel. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Dinesh *et al* tahun 2013, *coelomic fluid* cacing tanah *Eudrilus eugeniae* juga memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa, sel kanker kolon, sel tumor ganas darah putih dan sel tumor otak, efek sitotoksik tersebut tergantung dari jenis sel lines dan konsentrasi pemberian *coelomic fluid* (Dinesh *et al.* 2013).

2.3.3 *Coelomic Cytolytic Factor-1 (CCF-1)* sebagai analog dari TNF

Dari penjelasan diatas disebutkan bahwa molekul pada invertebrata memiliki aktivitas tumorolitik yang dapat disamakan dengan peran sitokin TNF pada vertebrata.

Aktivitas litik yang signifikan pada *coelomic fluid Eisenia fetida* pada sel line L929 sensitif terhadap faktor nekrosis tumor (TNF) telah diamati. Menariknya, *coelomic fluid* memiliki aktivitas sitolitik pada sel line yang sensitif terhadap TNF (Bilej *et al.* 1995).

Isolasi pada protein litik ditemukan protein 42-kDa yang disebut *coelomic cytolytic factor-1 (CCF-1)*. Pada aktivitas litik seperti TNF, CCF-1 menunjukkan kesamaan



dengan sitokin mamalia. CCF-1 di sekresikan oleh *coelomocytes* yang seperti makrofag, sementara TNF diproduksi oleh makrofag (Bilej *et al.* 1995). Pada penelitian yang telah dilakukan, pemberian antibodi monoklonal memberikan reaksi terhadap domain TNF seperti lektin yang juga bereaksi terhadap CCF-1 dan begitu sebaliknya, antibodi monoklonal melawan CCF-1 bereaksi juga terhadap TNF (Magez *et al.* 1997).

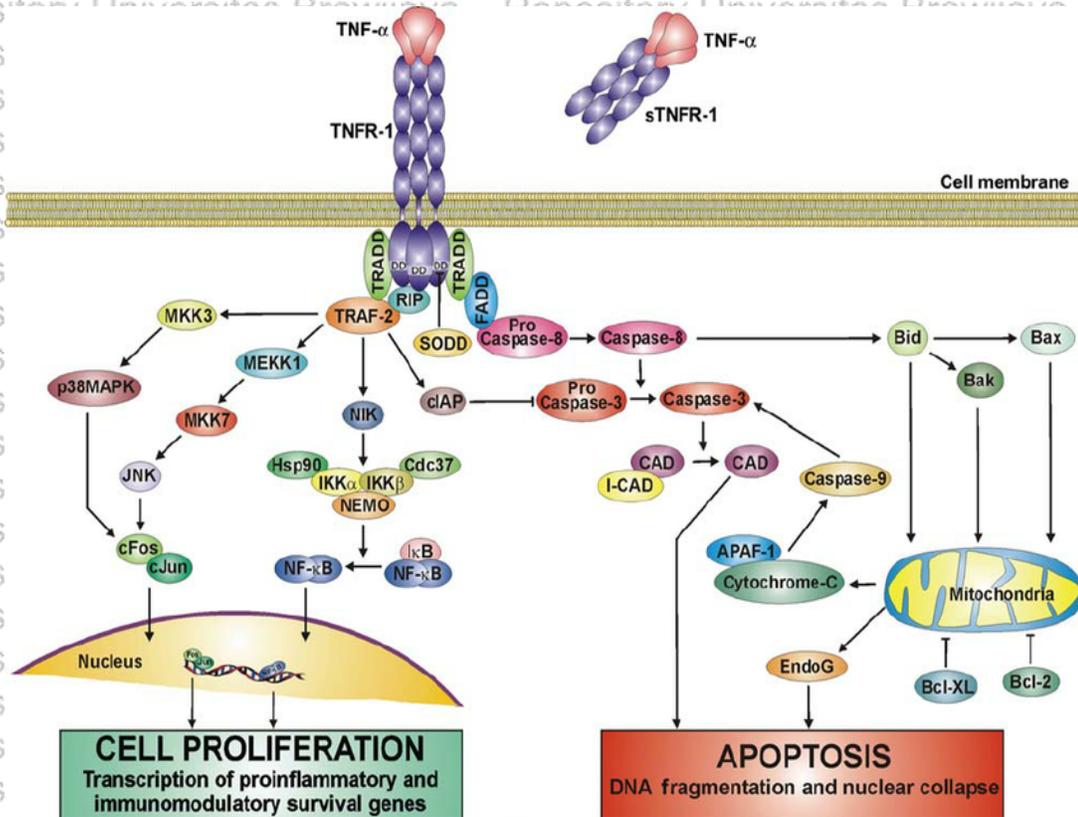
2.3.4 Peran TNF

Tumor Necrosis factor (TNF) merupakan sitokin multifungsi yang berperan dalam berbagai kegiatan seluler seperti kelangsungan hidup sel, proliferasi, diferensiasi, dan kematian. Sebagai sitokin pro-inflamasi, TNF disekresikan oleh sel yang mengalami inflamasi, yang mungkin juga terlibat dalam peradangan dari karsinogenesis. TNF menjalankan fungsinya dengan mengaktifkan *nuclear factor κB* (NF-κB) dan *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). Pada kanker, TNF memiliki dua fungsi. Disatu sisi, TNF dapat menjadi promotor tumor karena TNF merangsang pertumbuhan sel kanker, proliferasi, invasi dan metastasis, dan tumor angiogenesis. Di sisi lain, TNF bisa menjadi pembunuh kanker. Fungsi TNF dalam menyebabkan kematian sel kanker menjadikannya sebagai potensi untuk terapi kanker (Wang & Lin, 2008).

TNF memiliki dua macam reseptor, yaitu TNF reseptor 1 (TNFR-1) dan TNF reseptor 2 (TNFR-2). TNFR-1 terdapat di semua tipe sel, sedangkan TNFR-2 hanya di ekspresikan pada sel imun (Aggarwal, 2003). Meskipun semua reseptor berikatan dengan TNF, TNFR-1 merupakan reseptor utama yang memediasi efek seluler dari TNF. TNFR-1 memiliki *death domain* (DD), berfungsi dalam menginduksi kematian sel secara apoptosis. Meskipun TNFR-2 tidak memiliki DD, TNFR-2 dapat menginduksi



kematian sel melalui jalur tidak langsung TNFR-1 (Wajant, *et al.* 2003). TNFR-1 berikatan dengan TNFR-associated death domain (TRADD) yang diperantarai oleh DD. TRADD berfungsi sebagai platform untuk merekrut protein downstream adaptor sehingga menghasilkan sinyal yang berbeda. Protein adaptor tersebut meliputi, receptor interacting protein (RIP), TNFR-associated factor 2 (TRAF-2), dan Fas-associated death domain (FADD) yang akan mengambil molekul-molekul yang bertanggung jawab dalam pensinyalan intraseluler untuk mengaktifkan NF- κ B, mitogen-activated protein (MAPK), dan kematian sel (Horsssen, *et al.* 2006).



Gambar 2.4 TNF signaling pathway. TNF berikatan dengan TNFR-1 memicu ikatan dengan TRADD yang diperantarai oleh DD. TRADD kemudian merekrut protein adaptor meliputi RIF, TRAF-2 dan FADD. Protein adaptor tersebut berperan sebagai mediasi TNF dalam menginduksi proliferasi sel dan apoptosis (Horsssen, *et al.* 2006).



2.3.5 TNF sebagai agen anti-kanker

TNF menginduksi apoptosis pada berbagai jenis sel melalui sinyal kompleks TNFR-1 dengan TRADD, RIP, FADD dan *caspase-8*. *Caspase-8* diaktifkan secara otomatis untuk memicu aktivasi pelepasan dari *caspase-3*, *caspase-7*, dan endonuklease yang mengakibatkan hancurnya komponen protein sel, fragmentasi DNA, dan akhirnya kematian sel secara apoptosis (Wang & Lin, 2008). Mekanisme jalur apoptosis yang dimediasi reseptor ini disebut dengan *extrinsic pathway*.

Apoptosis yang diinduksi oleh TNF juga dimediasi oleh mitokondria (*intrinsic pathway*). Hal ini diperankan oleh *caspase-8* yang mengaktifkan BCL-2 *interacting domain* (Bid). Pembelahan Bid oleh *caspase-8* menghasilkan tBid, yang bermigrasi ke mitokondria dan menyebabkan mitokondria melepaskan sitokrom c dan *second mitochondria-derived aktivator of caspase* (Smac)/*direct IAP binding protein with low pI* (DIABLO) dari mitokondria ke sitosol. Sitokrom c berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) dan *pro-caspase 9* untuk membentuk apoptosom, yang menghasilkan aktivasi *caspase-9* yang memediasi aktivasi dari *executor caspase* (Holler N, et al. 2000). Smac akan berikatan dan menghambat protein anti-apoptosis (IAP) kemudian menyebabkan apoptosis (Horssen, et al. 2006).

TNF juga dapat menginduksi apoptosis melalui *reactive oxygen species* (ROS). Dalam hal ini, TNF akan berikatan dengan protein adaptor RIP. Ini ditunjukkan dengan faktor *survival NF- κ B* menginduksi enzim penawar ROS seperti *superoxidase dismutase* (Delhalle et al, 2002). Induksi produksi ROS atau penghambatan jalur NF- κ B oleh *cyclooxygenase-2* (COX-2) *inhibitor* dilaporkan berhasil dalam meningkatkan kepekaan sel tumor terhadap apoptosis yang diinduksi oleh TNF (Totzke et al, 2003).

Sejumlah strategi baru untuk sensitisasi kematian sel tumor melalui TNF telah



dipelajari. Fungsi TNF dalam aktivasi NF- κ B dikenal sebagai mekanisme utama dimana sel tumor dapat lolos dari sitotoksitas akibat TNF, pengaruh penyumbatan NF- κ B akibat sensitivitas TNF telah dipelajari secara ekstensif dalam berbagai sistem eksperimental. Sejumlah agen, termasuk senyawa alami dan senyawa sintesis, menunjukkan bahwa TNF dapat menginduksi kematian sel pada sel kanker melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Menggabungkan senyawa tersebut dengan TNF memberikan efek yang sinergis terhadap sitotoksitas pada sel tumor (Zhou *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2004; Shishodia *et al.* 2006). Pada penelitian yang dilakukan Zhou dan kawan-kawan tahun 2008, menunjukkan bahwa Akt berperan terhadap aktivasi NF- κ B yang diinduksi oleh TNF di sel kanker paru-paru, penelitian tersebut menyelidiki dan menemukan bahwa secara bersamaan menekan NF- κ B dan Akt secara sinergis memicu sitotoksitas yang diinduksi TNF pada sel kanker paru-paru (Zhou *et al.*, 2008).

2.4 Kalsium

2.4.1 Peran Kalsium

Kalsium memiliki peran dalam mengatur fungsi dari sel, perubahan dari kalsium di sitosol dapat mengakibatkan terjadinya proliferasi sel, transkripsi gen, dan kematian sel (Parkash, 2010). Pada saat sel istirahat, konsentrasi kalsium intraseluler ($[Ca^{2+}]_i$) diatur kurang lebih 100 nM, sedangkan konsentrasi kalsium ekstraseluler lebih tinggi, antara 1-2 mM (Machaca, 2011). Pompa kalsium, saluran dan protein pengikat kalsium digunakan oleh sel untuk mempertahankan homeostatis sel dan melakukan fungsi sel tertentu, dan disebut sebagai alat molekuler untuk pensinyalan kalsium. Perubahan Ca^{2+} bebas di sitosol dapat melibatkan peningkatan keseluruhan Ca^{2+} intraseluler yang bersifat sementara atau berkelanjutan, atau peningkatan yang

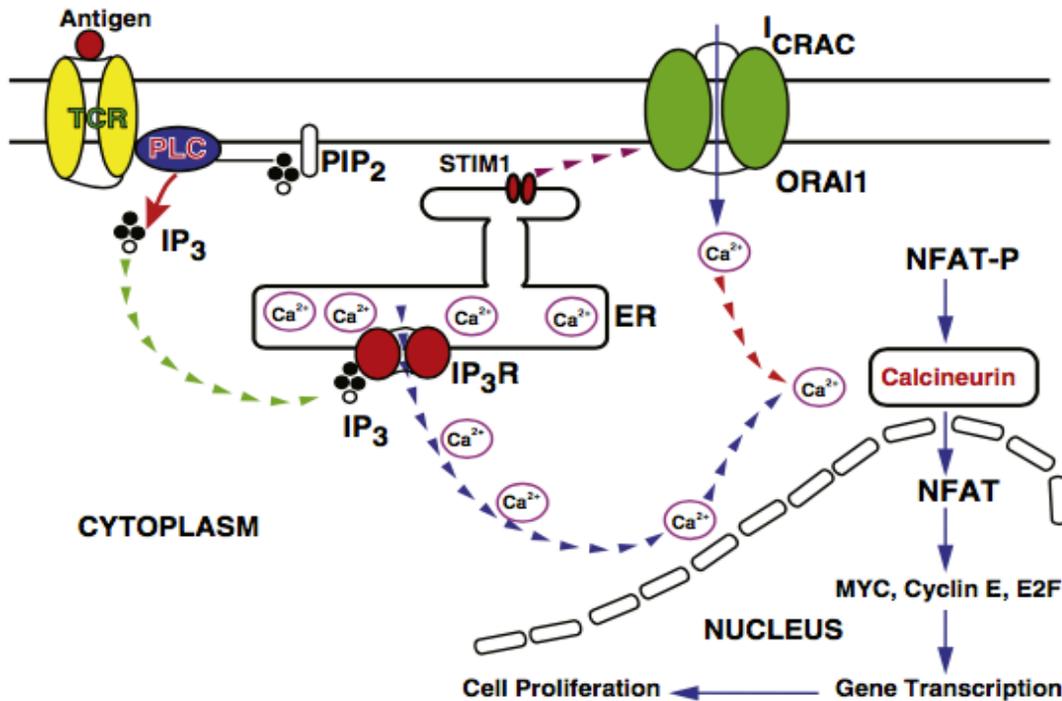


terlokalisir, atau terjadinya osilasi (Prevarskaya et al. 2014). Perubahan ini akan diterjemahkan sel, yang memungkinkan terjadinya sinyal kalsium dimana-mana sehingga secara khusus mengatur proses seluler (Berridge, et al, 2003). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler yang terus-menerus akan menjadi racun dan memicu kematian sel (McConkey, 1997). Selain itu peningkatan Ca^{2+} intraseluler yang terus-menerus dapat mengaktifkan protease sistein (Calpain) dalam menginduksi terjadinya pembelahan dan perpindahan protein FAK (Sundaramoorthy et al. 2015). Oleh sebab itu, sinyal Ca^{2+} dalam bentuk gelombang, *spikes* atau osilasi harus diatur secara spasial-temporal (Baundouin et al. 2003). Diantara tiga bentuk sinyal Ca^{2+} , osilasi Ca^{2+} intraseluler memiliki peran dalam menyalurkan informasi biologi. Contohnya, pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa osilasi dari Ca^{2+} intraseluler menyediakan sinyal proliferasi untuk sel kanker esofagus (Zhu H, et al, 2014). Secara khusus, frekuensi, amplitudo, dan durasi dari osilasi Ca^{2+} intraseluler menyusun kode spesifik Ca^{2+} yang mengaktifkan faktor transkripsi untuk gen transkripsi, proliferasi sel, dan migrasi (Parekh, 2011). Penguraian bentuk osilasi yang dicapai oleh efektor intraseluler *downstream*, termasuk calmodulin (CaM), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), *nuclear faktor-kb* (NF- κ B), *calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) dan calpain akan mengaktifkan proses seluler yang berbeda (Smedler & Uhlen, 2013; Cullen, 2003).

Ca^{2+} berperan penting dalam siklus sel dari mamalia, seperti pada awal G_1 , pada transisi G_1/S , dan G_2/M . Penghambatan Ca^{2+} melalui *cyclin-dependent kinase* 4 (CDK4) dan CDK2 akan menyebabkan siklus sel terhenti pada tahap G_1 . *Influx* dari Ca^{2+} melalui membran plasma *channels* seperti pada ORAI dan *efflux* Ca^{2+} dari ER menyebabkan terjadinya peningkatan Ca^{2+} intraseluler. Peningkatan Ca^{2+} intraseluler



pada kanker juga akan mengaktifkan NFAT yang berada di sitoplasma menjadi aktif dan berpindah ke nukleus dan meregulasi ekspresi dari gen target. Overekspresi dari NFAT akan menginduksi ekspresi dari Myc, cyclins D1 dan D2 (CCND2) sehingga terjadi proliferasi dari sel (Parkash and Asotra, 2010; Gwack *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 Gelombang Ca²⁺ mengaktifkan faktor transkripsi NFAT yang mengontrol siklus sel. Perubahan dari frekuensi gelombang osilasi Ca²⁺ akan mengaktifkan NFAT melalui *calcineurin* sehingga terjadi regulasi dari transkripsi sel (Parkash and Asotra, 2010).

Kalsium juga mempengaruhi fungsi mitokondria pada kehidupan dan kematian sel. Lokasi mitokondria terletak berdekatan dengan ER dan membran plasma, hal ini menjadikan mitokondria dekat dengan sumber peningkatan konsentrasi kalsium. Mitokondria memiliki fungsi untuk titik awal metabolisme yang aktivasinya bergantung pada kalsium. Mitokondria merupakan struktur penting dalam apoptosis dengan kemampuannya melepaskan kofaktor caspase. Jalur apoptosis



instriksik diaktifkan dengan pelepasan berbagai protein mitokondria ke dalam sitosol.

Protein utama yang mempengaruhi aktivasi apoptosis adalah *cytochrome-c*.

Mitokondria mengandung berbagai protein proapoptotik intermembran misalnya

Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF dan EndoG. Homeostasis dari Ca^{2+} mempengaruhi

terjadinya proses apoptosis karena kerja dari protein Bcl-2 sebagai anti-apoptosis

dipengaruhi oleh kadar Ca^{2+} dalam mitokondria dan ER (Pinton et al., 2008).

2.4.2 Sinyal Kalsium Intraselular

Pada sel yang tereksitasi, jalur utama untuk masuknya Ca^{2+} adalah melalui

jalur Ca^{2+} selektif kanal Ca^{2+} yang terjaga tegangannya (VGCC). Berdasarkan tata

nama abjad penamaan VGCC diganti dengan nomenklatur numerik standar: Cav1.1-

1.4, Cav2.1-2.3, Cav3.1-3.3. Pada sel otot rangka, tambahan jalur tegangan sensitif

disediakan oleh reseptor *dihydropyridine* (DHPR, Cav1.1) yang tidak dilewati sejumlah

besar Ca^{2+} namun secara fisik digabungkan dengan saluran reseptor ryanodin (RyR)

pada membran retikulum sarkoplasma dan endoplasma (ER). Secara tidak langsung,

tegangan juga memodulasi jumlah masuknya Ca^{2+} melalui semua saluran independen

Ca^{2+} dengan memodifikasi kekuatan pendorong masuknya Ca^{2+} . Kalsium akan lebih

banyak masuk pada keadaan hiperpolarisasi (Nowycky 2002).

Kalsium intraseluler ($[Ca^{2+}]_i$) bertindak sebagai *second messenger* dan

berperan dalam fungsi fisiologi sel, meliputi ekspresi gen, mengatur siklus sel,

motilitas sel, migrasi, dan apoptosis. Di dalam sel itu sendiri, ada gradien konsentrasi

Ca^{2+} lebih lanjut antara sitosol dan beberapa organela, seperti sarkoplasmik atau

endoplasmik retikulum (SR/ER). Organel tersebut bertindak sebagai penyimpanan

Ca^{2+} , yang difasilitasi oleh protein pengikat Ca^{2+} seperti *calsequestrin* dan *calreticulin*

(Berridge et al, 2003). Ca^{2+} dilepaskan dari penyimpanannya melalui inositol 1,4,5-

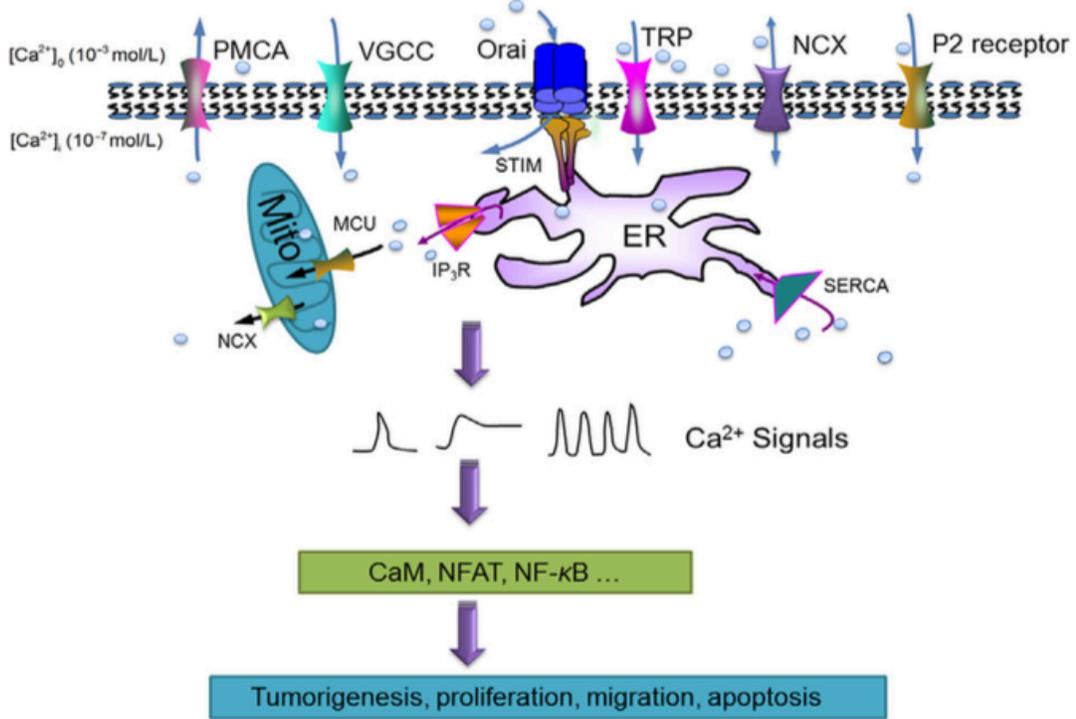


triphosphate (IP₃). Meskipun sulit dalam menghitung jumlah Ca²⁺ di sitosol, pada saat istirahat jumlah Ca²⁺ di dalam SR/ER berkisar antara 100-500 μM. Tidak seperti layaknya SR/ER, mitokondria memiliki kapasitas penyimpanan Ca²⁺ yang tidak cukup besar. Namun hal ini mungkin sesuai dengan jumlah untuk sinyal Ca²⁺, dan pengambilan dari Ca²⁺ akan mengaktifkan enzim mitokondria. Akumulasi berlebih dari Ca²⁺ di mitokondria akan memicu terjadinya apoptosis (Monteith et al. 2007). Ca²⁺ seringkali dilihat hanya sebagai peralihan, dimana Ca²⁺ sitosol akan meningkat menyebabkan terbukanya saluran Ca²⁺ pada membran plasma atau pada membran dari tempat penyimpanan internal, yang bertindak sebagai pemicu terjadinya Ca²⁺-dependent. Namun, untuk mencapai suatu kontrol yang tepat pada proses sel (sebagai contohnya, kontraksi dan transkripsi pada sel epitel), homeostasis Ca²⁺ harus dikontrol dengan ketat (Santella et al, 2005). Amplitudo dan frekuensi sinyal Ca²⁺ harus diatur secara tepat untuk mencapai hasil spesifik, seperti regulasi siklus sel, apoptosis atau proliferasi untuk sel (Lipskala et al, 2004). Ada 3 kelas utama protein membran yang secara langsung berhubungan dengan Ca²⁺ homeostasis, yaitu saluran (*channel*), ATPase (pompa), dan penukaran (*exchangers*) (Monteith et al. 2007).

Berikut ini adalah berbagai macam jenis transporter dan channels yang mengatur homeostasis Ca²⁺ intraseluler; 1) IP₃R atau reseptor ryanodine (RyR) memediasi terlepasnya Ca²⁺ dari SR/ER; 2) Ca²⁺-ATPase memompa Ca²⁺ dari sitosol kembali ke ER/SR atau ke ruang ekstraseluler. 3) Ca²⁺ *channel* atau transporter yang berfungsi sebagai jalur masuknya Ca²⁺ ekstraseluler melewati membran plasma menuju intraseluler seperti *voltage-gated Ca²⁺ channel* (VGCC), *transient receptor potential channel* (TRP), Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel (CRAC),



$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) dan reseptor purinergik; (4) mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) meregulasi pengambilan Ca^{2+} di mitokondria (Cui et al. 2017)



Gambar 2.6 Peran penting Ca^{2+} channels, pumps dan transportes pada sel kanker. Keterangan :Dinamika Ca^{2+} intraselular diatur oleh beberapa protein; (1) IP_3Rs memediasi pengeluaran Ca^{2+} dari ER; (2) Ca^{2+} ATPase memompa Ca^{2+} dari sitosol menuju ER atau ekstraseluler; (3) membran plasma Ca^{2+} channels atau transporter, seperti VGCCs, TRPs, CRACs, NCXs dan reseptor P2; (4) mitokondria Ca^{2+} uniporter. Sinyal Ca^{2+} yang diatur ketat dalam bentuk gelombang, lonjakan atau osilasi dapat mengatur berbagai aktivitas seluler, termasuk transkripsi gen, proliferasi, migrasi dan apoptosis (Cui et al. 2017).

2.4.3 Perubahan Saluran dan Pompa Ca^{2+} pada Kanker

Kemampuan dari pensinyalan Ca^{2+} dalam mengatur jalur seperti pada proliferasi dan apoptosis menunjukkan bahwa terapi yang memodulasi sinyal Ca^{2+} di sel kanker mungkin merupakan pilihan terapeutik. Perubahan ekspresi saluran Ca^{2+} atau pompa pada kanker menjadi target terapi yang jelas (Monteith et al. 2007). Perubahan ekspresi atau aktivitas dari Ca^{2+} channels dan pumps dapat menjadi



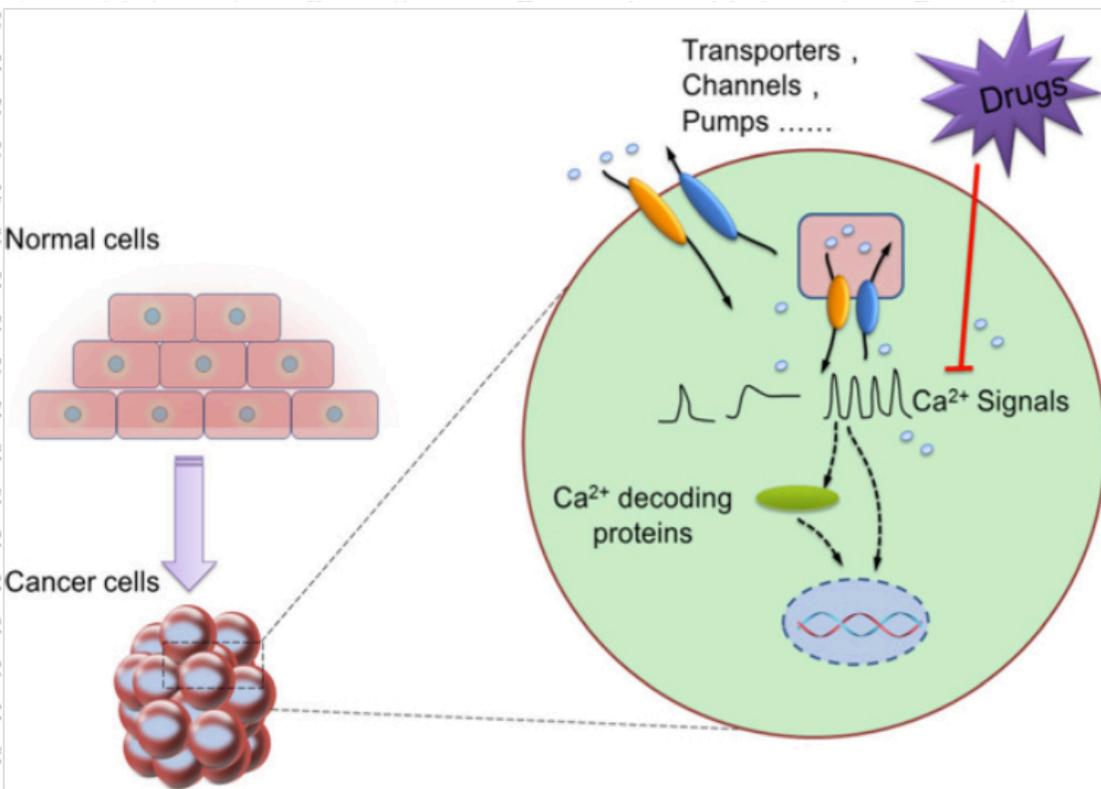
penyebab atau memicu terjadinya kanker. Sebagai contohnya, peningkatan ekspresi dari membran plasma Ca^{2+} channel dapat meningkatkan influx dari Ca^{2+} dan memicu jalur proliferasi Ca^{2+} -dependent (Berridge *et al.*, 2003). Perubahan aktivitas IP_3R dan/atau perubahan dari profil ekspresi IP_3R telah ditemukan di sejumlah jenis sel kanker. Dibandingkan dengan jaringan otak normal, sampel glioblastoma manusia menunjukkan penurunan IP_3R1 dan peningkatan IP_3R3 (Cui *et al.*, 2017). Upregulasi IP_3R3 telah diamati pada sel line kanker lambung. Dalam penelitian klinis yang dilakukan oleh Shibao dan kawan-kawan, melaporkan bahwa ekspresi isoform IP_3 dikaitkan dengan perkembangan kanker kolorektal dengan menggunakan jaringan karsinoma kolorektal yang dibedah saat operasi pada seratus pasien. Mereka menemukan bahwa reseptor IP_3R1 dan IP_3R2 di ekspresikan pada mukosa normal kolorektal dan kanker kolorektal, sedangkan IP_3R3 hanya ditemukan pada kanker kolon, terutama pada keadaan invasi yang sudah jauh, metastasis ke getah bening, metastasis ke hati, dan pada stadium TNM yang tinggi. Ekspresi tinggi IP_3R3 berhubungan dengan agresivitas dari karsinoma kolorektal (shibao *et al.*, 2010).

Di antara anggota keluarga Ca^{2+} -ATPases, SERCA adalah yang terbaik. SERCA bertanggung jawab dalam pengisian Ca^{2+} di ER, menjaga agar protein tetap dilipat/maturasi sementara disregulasi dari SERCA dapat menyebabkan hilangnya atau berlebihnya kapasitas penyimpanan Ca^{2+} di ER, meningkatkan stress dari ER, disregulasi *chaperones* dan sintesis lipid. Mutasi dan perubahan ekspresi dari isoform SERCA telah diidentifikasi pada berbagai jenis kanker, seperti kanker kolon, lambung, paru-paru, myeloid leukemia dan tumor plexus choroid (Brouland *et al.*, 2005). Pada sel kanker kolorektal ditemukan adanya ekspresi berlebih dari SERCA 2, yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel (Fan *et al.*, 2014). Di sisi lain, SERCA3 dilaporkan telah hilang secara progresif selama proses *multistage* dari tumorigenesis



kolon setelah ekspresi meningkat pada awal selama diferensiasi sel (Brouland *et al*, 2005).

VGCC bertindak sebagai perantara cepat Ca^{2+} influx pada saat membran depolarisasi. Berdasarkan meta-analisis baru-baru ini dari kumpulan data *microarray* mengungkapkan profil gen mRNA VGCC dari berbagai jenis kanker (Wang *et al*, 2015). Ca^{2+} channel tipe L terlibat dalam pengembangan dan perkembangan beberapa tumor, seperti peningkatan secara signifikan pada kanker kolon dan esofagus. Novel dari variasi Ca^{2+} channel tipe L ditemukan di sel kanker glioma manusia, payudara, ovarium, kolon, prostat dan esofagus (Dziegielewska, 2014).



Gambar 2.7 Mekanisme obat dalam menghambat influx Ca^{2+} . Abnormal Ca^{2+} signaling berdasarkan ekspresi atau aktivasi saluran yang berubah berkontribusi pada karsinogenesis dan mendorong perkembangan tumor. Ketidakteraturan Ca^{2+} chnnels/transporters/pump menjadi target kemoterapi yang menjanjikan untuk pengobatan kanker (Cui *et al*. 2017).



Sejumlah besar anggota TRP (TRPC, TRPM, dan TRPV) memiliki korelasi dengan pertumbuhan dan perkembangan kanker. Ekspresi berlebihan dari TRPC1, TRPC6, TRPM7, TRPM8, dan TRPV6 ditemukan pada kanker payudara, dan profil ekspresinya berkaitan dengan parameter patologi, sehingga dapat digunakan sebagai marker untuk prognosis (Ouaidd *et al*, 2013). TRPM7 diekspresikan tinggi dan sebagai perantara Ca^{2+} influx yang menyebabkan proliferasi dan diferensiasi yang buruk (Guilbert *et al*, 2009). Oleh karena itu, ekspresi TRP telah diusulkan sebagai alat untuk diagnosis atau memprediksi prognosis pada beberapa jenis kanker, dan menargetkan TRP *channel* telah sebagai strategi terapeutik baru (Nilius, 2007).

Mitochondria mampu mengambil Ca^{2+} secara cepat kemudian secara aktif membentuk sinyal Ca^{2+} secara keseluruhan. Pengambilan Ca^{2+} diperantarai oleh mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) dan diatur oleh protein mitokondria Ca^{2+} uptake 1 (MICU1) (Brookes *et al*, 2004). Akumulasi Ca^{2+} mitokondria dengan cepat dipompa kembali ke sitosol oleh NCX dan H^+ / Ca^{2+} exchangers (HCX) (Curry *et al*, 2013). Dilaporkan bahwa ekspresi MCU turun pada kanker kolon dan kanker prostat, hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya proliferasi dan resistensi terhadap kematian sel melalui penurunan kadar mitokondria Ca^{2+} (Marchi *et al*, 2013). Selain adanya penurunan ekspresi MCU pada kanker, overekspresi dari protein bcl-2 menghambat masuknya Ca^{2+} intraseluler ke dalam mitokondria dan ER sehingga tidak terjadi proses apoptosis (Pinton *et al.*, 2008).

2.5 Focal Adhesion Kinase (FAK)

Focal Adhesion Kinase (FAK) merupakan protein non reseptor tirosin kinase yang dapat diaktifkan apabila terjadi interaksi dengan integrin, reseptor sitokin, *Growth*



Factor Reseptor dan *G Protein- Coupled Reseptor* (Yoon *et al.*, 2014). FAK mengatur perlekatan sel, proliferasi, survival dan motilitas sel. Gen FAK terdapat pada kromosom manusia 8q24.3 dan tidak bertindak sebagai onkogen, namun protein FAK di ekspresikan berlebih dalam berbagai kanker sehingga bertindak sebagai onkogen (Sundaramoorthy *et al.*, 2015). Protein FAK diekspresikan berlebih pada berbagai jenis kanker, meliputi kanker ovarium, serviks, ginjal, paru-paru, otak, kolon, payudara dan kulit (Golubovsky *et al.*, 2009). Satu mekanisme penting dari ekspresi berlebih FAK adalah amplifikasi gen, dan peningkatan mRNA FAK yang didapatkan dari peningkatan ekspresinya (Sulzmaier *et al.*, 2014). Peningkatan ekspresi FAK ini juga ditemukan pada tumor yang invasif dan metastase, meliputi kanker kepala dan leher, paru-paru, kolon, dan payudara (Yoon *et al.*, 2015). Gen amplifikasi FAK merupakan faktor prognosis buruk dari kanker serta petanda penting dalam kanker lambung dan pada kanker payudara. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekspresi berlebih FAK terkait dengan prognosis buruk pada beberapa jenis tumor pada manusia (Yom *et al.*, 2011). FAK yang aktif berperan penting sebagai mediator kunci dalam perkembangan tumor dan metastasis. Oleh sebab itu, FAK dijadikan sebagai potensial target terapi untuk kanker (Tai *et al.*, 2015).

2.5.1 Fungsi *Focal Adhesion Kinase* (FAK)

Berdasarkan fungsinya, FAK terbagi menjadi dua kategori, yaitu *kinase-dependent* dan *kinase-independent*. Fungsi FAK *kinase-dependent* dikaitkan dengan integrin dan terkait sinyal pada adhesi fokal dimana FAK memerankan peran penting dalam migrasi selular dan adesi pada sel normal maupun kanker (Yoon *et al.*, 2015).



2.3 Tabel Overekspresi FAK pada kanker

Tumor Type	Occurrences*	References
Head and neck squamous cell carcinoma	~62%	(Canel et al. 2006; He et al. 2006)
Neuroblastoma	~73%	(Beierle et al. 2008)
Breast cancer	~25-77%	(Cance et al. 2000b; Lark et al. 2005)
Colorectal cancer	~40-86%	(Cance et al. 2000b; Theocharis et al. 2003)
Pancreatic cancer	~48%	(Furuyama et al. 2006)
Esophageal cancer	~59%	(Miyazaki et al. 2003)
Lung cancer	~44%	(Wang et al. 2005)
Small-cell lung cancer	~59%	(Ocak et al. 2012)
Ovarian cancer	~68%	(Sood et al. 2004)

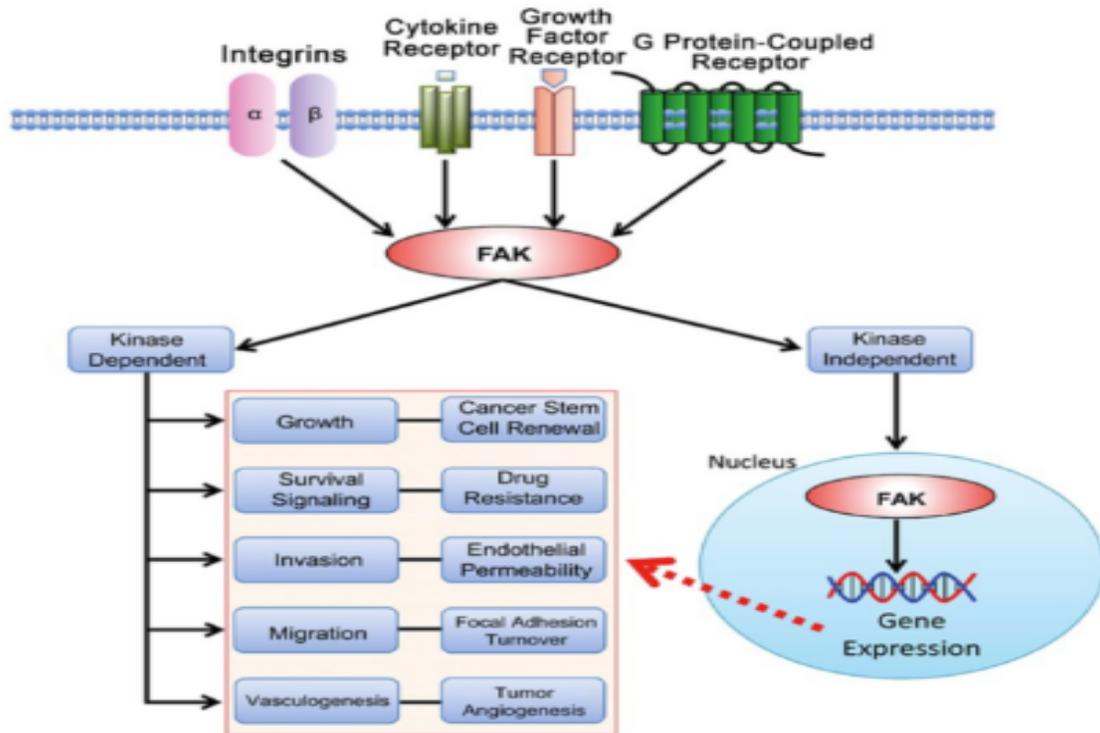
Keterangan : diambil dari Yoon *et al.*, 2015.

Selain itu, FAK juga sebagai rangka dan berperan dalam interaksi protein-protein melalui fungsi kinase-independent nya. Menariknya, FAK yang berada di nukleus dan berinteraksi langsung dengan p53 akan memicu proliferasi sel dan kelangsungan hidup melalui degradasi p53 (Lim *et al.*, 2008). Hal ini menunjukkan fungsi baru FAK di nukleus terkait kinase-independent (Yoon *et al.*, 2015). FAK terbagi menjadi tiga bagian, N-terminal FERM, sentral kinase, dan domain C-terminal. Bagian FAK FERM yang unik adalah non-katalitik, hal ini mirip dan dapat kita jumpai juga pada Janus kinase (JAK). Domain FAK FERM terbagi menjadi tiga bagian kecil, yaitu F1, F2, dan F3 (Ceccarelli *et al.*, 2006). Reseptor dari *growth factor* dan kemokin adalah protein membran yang berikatan dengan bagian FAK FERM. Domain FAK FERM berisi *Nuclear Localization Signal* (NLS), dan baru-baru ini, beberapa protein inti telah diidentifikasi sebagai protein pengikat FERM. Bagian F1 dari FAK FERM berikatan dengan p53 yang memicu terjadinya kelangsungan hidup sel (Lim *et al.*, 2008).

Aktivitas FAK *kinase-independent* dikaitkan dengan FAK FERM subdomain F1 dan didasarkan pada NLS di subdomain F2. Subdomain F3 dikaitkan dengan Mdm-2 yang mana akan meningkatkan p53 ubiquitinasi. Domain FERM juga secara langsung



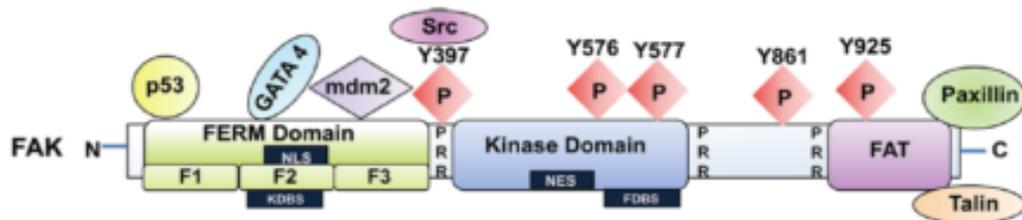
berikatan dengan GATA4 yang merupakan faktor transkripsi, pada penghambatan FAK akan meningkatkan degradasi GATA4 yang menghasilkan regulasi pemberian sinyal anti inflamasi melalui ekspresi molekul adhesi sel vaskular-1 (VCAM-1). Hal ini menunjukkan bahwa domain FAK FERM memiliki peran yang sangat penting dalam regulasi selular dengan cara berikatan pada membran dan protein adhesi serta faktor transkripsi (Lim *et al.*, 2012).



Gambar 2.8 Jalur Sinyal FAK pada kanker. Integrin dan reseptor sitokin (CR), growth factor reseptor (GFR), dan G-protein coupled receptors (GPCR) adalah reseptor transmembran permukaan sel yang mentransmisikan sinyal ekstraselular ke FAK. Aktivasi FAK memicu kaskade sinyal dalam berbagai proses sel: sinyal keberlanjutan, pertumbuhan, angiogenesis, migrasi, dan invasi. Pada kanker, FAK diekspresikan secara berlebihan dan diaktifkan dan kemungkinan jalur pensinyalan FAK dideregulasi pada sel kanker. FAK berfungsi pada *kinase-dependent* dan *kinase-independent*. Kinase-independent menyebabkan FAK masuk ke nukleus dan mengatur ekspresi gen untuk mempengaruhi perkembangan kanker (Tai *et al.*, 2015).



Domain FAK kinase terletak di bagian tengah FAK dan terdiri dari lengkung (loop) aktivasi, letak tirosin (Y) Y576 dan Y755, yang mana dapat difosforilasi oleh Src dan berfungsi mengatur aktivitas FAK kinase. Rangsangan pada integrin, reseptor faktor pertumbuhan dan reseptor kemokin menghasilkan autofosforilasi cepat pada Y397. Ikatan fosforilasi FAK-Src lebih lanjut akan mengaktifkan lengkung (loop) Y576/577 dan penting untuk aktivitas katalik dari kinase. Domain FAK C-terminal terdiri dari *focal adhesion targeting* (FAT) dan dua rangkaian kaya prolin yang memungkinkan mentransmisikan sinyal ekstraselular melalui fosforilasi tirosin ke beragam molekul intraselular di bagian dalam sel pada *adhesion-dependent* dan *growth factor dependent manners* (Yoon *et al*, 2015).



Gambar 2.9 Skema struktur FAK. FAK terdiri dari domain N dan C-terminal dan domain sentral kinase. FAK N-terminal terdiri FERM (band 4, 1, ezrin, radix, moesin) domain, yang terbagi lagi menjadi F1, F2, F3 subdomain. FAK autofosforilasi pada tirosin Y397, yang terletak di ujung N-terminus dan awal domain kinase, dan ada empat lokasi fosforilasi tambahan pada protein (Y576, Y577, Y861, dan Y925). Pada fosforilasi Y397, Src tirosin kinase berikatan dengan lokasi Y397, dan kompleks FAK-Src selanjutnya memfosforilasi loop oksidasi Y576 / 577, yang penting untuk aktivitas katalik kinase. Beberapa protein pengatur, seperti p53, Mdm-2 dan reseptor faktor pertumbuhan, terikat pada domain FAK FERM. Domain C-terminal FAK terdiri dari FAT (*focal adhesion targeting*), yang mencakup dua situs tirosin, Y861 dan Y925; Fosforilasi FAK di tempat-tempat ini membuat lokasi pengikatan domain SH2 (Src homology-2), sedangkan daerah kaya prolin (PRR) menyediakan lokasi pengikat untuk protein yang mengandung SH3. Domain FAT berhubungan dengan reseptor integrin secara tidak langsung melalui *focal adhesion protein*, seperti paxillin dan talin (Yoon *et al*, 2015).



2.5.2 Fungsi FAK pada Sel Kanker

2.5.2.1 Gen Amplifikasi FAK

Beberapa penelitian telah membenarkan bahwa overekspresi dari FAK berkorelasi dengan buruknya prognosis pada beberapa jenis tumor (Yom *et al.*, 2011).

Salah satu mekanisme penting dari overekspresi FAK adalah amplifikasi dari gen, dan peningkatan mRNA FAK yang menyebabkan peningkatan ekspresi FAK. Hal ini juga ditemukan pada tumor invasif dan metastasis, termasuk kanker kepala dan leher, paru-paru, usus besar, dan payudara (Sulzmaier *et al.*, 2014).

2.5.2.2 Peran FAK pada Kelangsungan Hidup dan Proliferasi Sel Kanker

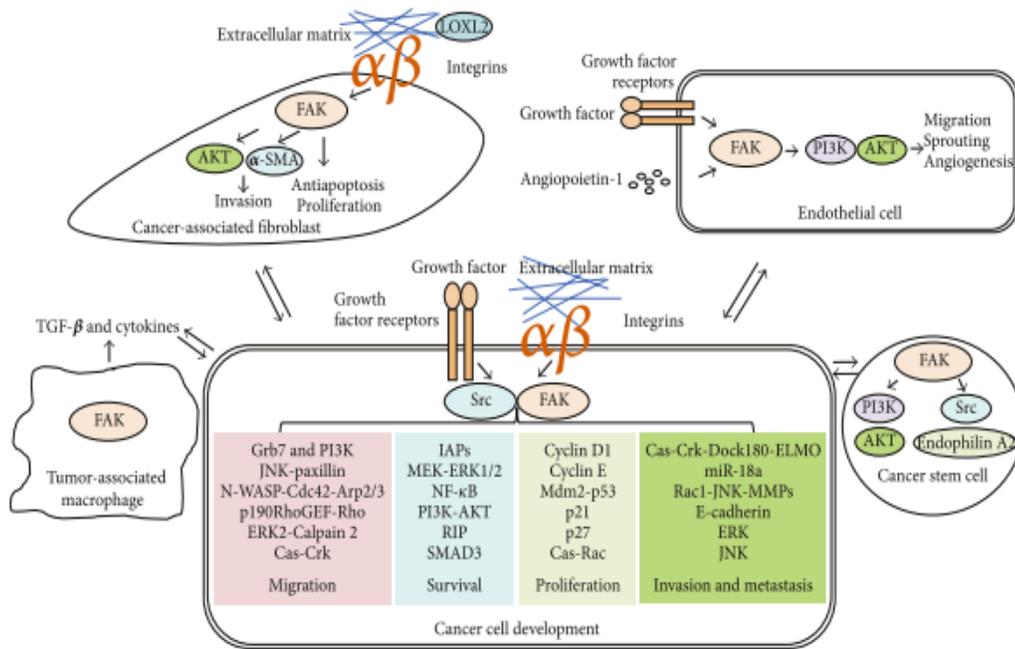
Overekspresi FAK pada sel kanker seringkali dikaitkan dengan resistensi dari pelepasan sel yang menyebabkan kematian sel. Pada sel kanker, kompleks FAK/Src yang meningkat memberikan pengaktifan transduser sinyal PI3K-AKT dan MEK-ERK1/2, sehingga meningkatkan kemampuan kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel kanker (Tai *et al.* 2015). Selain itu, beberapa sinyal upsteam lainnya juga berkontribusi pada resistensi anoikis yang dimediasi oleh FAK pada sel kanker.

Misalnya, transformasi growth factor- β (TGF- β) menginduksi aktivasi FAK dan AKT melalui SMAD3 dan p38 MAPK, yang menyebabkan resistensi anoikis dan promosi tumor (Horowitz *et al.*, 2007). Selain itu, overekspresi FAK telah terbukti menghambat apoptosis yang diinduksi caspase-3 namun sebaliknya, penghambatan FAK menyebabkan apoptosis pada sel kanker. Sifat anti apoptosis pada FAK ini mencegah kematian pada sel kanker yang terprogram. Pada dasarnya, ekspresi FAK secara berlebihan tampaknya terkait dengan aktivasi sinyal transduksi PI3K-AKT dan menyebabkan ekspresi dari *Protein Inhibitor Apoptosis* (IAPs) yang dimediasi oleh NF- κ B sehingga terjadi penghambatan apoptosis dengan cara menghambat caspase-



3. Demikian juga dengan fosforilasi NFKB dan aktivasi pensinyalan PI3K/AKT yang dimodulasi oleh FAK mencegah tumor necrosis factor- α (TNF- α) menginduksi apoptosis (Tai et al. 2015).

Proliferasi sel adalah proses peningkatan jumlah sel akibat pembelahan sel dan pertumbuhan. Penemuan ekspresi dan tirosin fosforilasi dari FAK berhubungan dengan perkembangan siklus sel dengan cara memodulasi molekul yang berhubungan siklus sel. Hal ini mendakan FAK berfungsi sebagai pengatur utama dalam mendorong proliferasi kanker. Ekspresi berlebih FAK menyebabkan peningkatan ekspresi siklin D1 dan menurunkan ekspresi p21 dalam menghambat *cyclin-dependent kinase* (CDK), sehingga mempercepat transisi fase G1 menjadi fase S (Malumbres, 2014). FAK menyebabkan pengembangan siklus sel dengan cara menghambat tumor supresor p53 yang menyebabkan apoptosis sel dan menghambat dari aktivitas transkripsi p53 (Tai et al. 2015).



Gambar 2.10 Sinyal transduksi FAK pada perkembangan sel kanker dan tumor.

Aktivasi FAK yang pada awalnya diperantarai oleh integrin yang terlibat dengan ECM dan juga oleh reseptor faktor pertumbuhan memungkinkan mengatur kelangsungan hidup, proliferasi, migrasi, invasi, dan metastasis dalam kaitannya dengan perkembangan kanker. Selanjutnya, kompleks FAK/Src *autophosphorylated* (pada Tyr397) menginduksi tirosin fosforilasi cascade dalam memodulasi jalur sinyal serbaguna. Sebagai contoh, FAK memodulasi fosforilasi endofilin A2 oleh sinyal Src atau PI3K-AKT pada sel induk kanker. Pada sel endotel, faktor pertumbuhan endotelial vaskular-A (VEGF-A) / VEGF atau sinyal angiopoietin-1 mengaktifkan PI3K / AKT yang dimediasi FAK untuk mempromosikan migrasi, tumbuh, dan angiogenesis. FAK juga mengatur ekspresi *growth factors* atau sitokin pada makrofag terkait tumor untuk memfasilitasi perkembangan kanker (Tai et al. 2015).

2.5.2.3 FAK menyebabkan metastasis Kanker

Sesuai dengan perannya yang penting dalam migrasi sel, FAK disimpulkan berperan penting dalam metastasis kanker. Sebenarnya, fosforilasi Tyr397 dan aktivitas kinase FAK merupakan substansi yang penting untuk fenotipe invasif dan juga metastasis kanker. Secara intrinsik, aktivitas FAK kinase berperan dalam metastasis kanker dengan mengatur ekspresi MMP9 dan aktivator plasminogen urokinase (Tai et al. 2015).

2.5.2.4 FAK pada Stem Cell Kanker

Stem cell Kanker (CSCs) memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi sel kanker dari populasi sel tumorigen yang tidak



berdiferensiasi (Patel dan Chen 2012). Studi terbaru juga menunjukkan bahwa FAK terlibat dalam ekspresi beberapa faktor dari stem sel. FAK mempertahankan ekspresi faktor transkripsi Slug dan Sox9, yang diidentifikasi sebagai faktor penting dalam mempertahankan CSC mamaria (Guo et al 2012). Sebagai tambahan, NANOG, penanda utama sel punca, meningkatkan tingkat ekspresi dan aktivitas FAK pada sel kanker 293, SW480, dan SW620 (Ho et al 2012). NANOG secara langsung mengikat promotor FAK yang memicu ekspresi FAK, dan penelitian menunjukkan bahwa *downregulating* ekspresi NANOG oleh siRNA dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, yang dapat dibalik mekanismenya dengan adanya over ekspresi FAK (Ho et al 2012). Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi FAK mungkin memiliki peran penting dalam pengendalian fungsi dan aktivitas CSC.

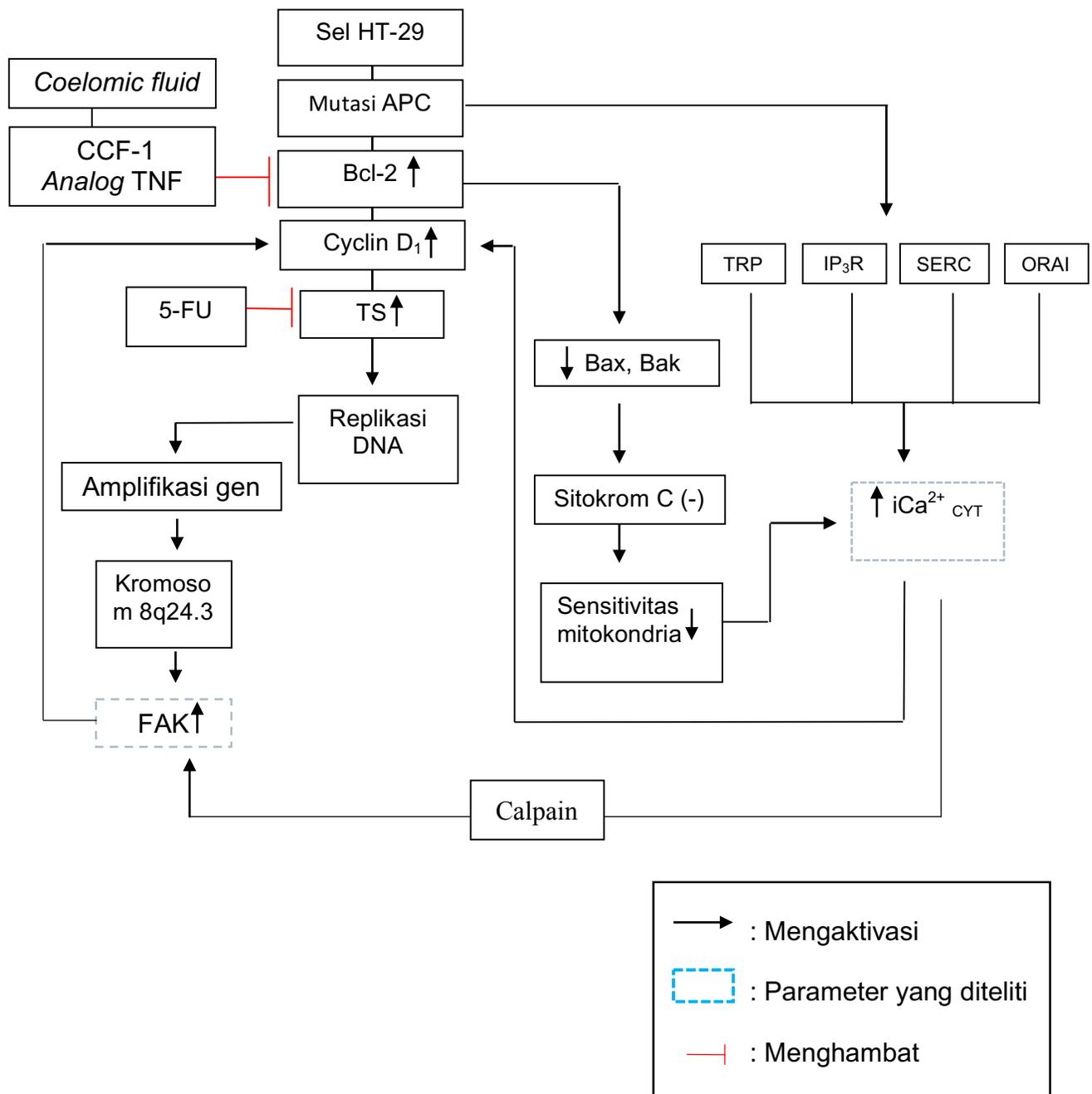
2.5.3 FAK menjadi Target Terapi

FAK diakui memiliki potensi sebagai target kanker yang potensial. Oleh karena itu, telah banyak upaya untuk menghambat sinyal FAK dalam terapi kanker. Bukti eksperimental juga menunjukkan bahwa FAK secara intrinsik terlibat dalam perkembangan keganasan tumor, hal ini menunjukkan bahwa FAK merupakan target yang menjanjikan untuk terapi antikanker. Perusahaan farmasi telah mengembangkan penghambat FAK secara farmakologis, dan beberapa di antaranya kebanyakan penghambat molekul kecil dan penghambat peptida kecil yang telah mencapai tahap klinis. Inhibitor FAK molekul kecil adalah analog ATP dalam bentuk pirimidin atau piridina. FAK inhibitor dapat digunakan untuk menghambat aktivitas FAK pada sel kanker dengan menghambat langsung aktivitas dari FAK kinase (Zhou et al, 2015).

BAB III

KERANGKA KONSEP PENELITIAN dan HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



3.1.1 Penjelasan kerangka konsep

Sel HT-29 adalah sel adenokarsinoma kolon manusia, patogenesis terjadinya kanker kolon melibatkan perubahan dari beberapa mutasi gen, baik yang bersifat onkogen maupun gen supresor tumor gen-gen tersebut adalah *adenomatous polyposis coli* (APC), yaitu gen supresor yang memproduksi protein APC. Mutasi dari protein APC akan menyebabkan transkripsi gen target seperti CCND1 yang nanti memproduksi protein *cyclin* D1. Pada kanker juga terjadi ketidakseimbangan antara anggota protein pro apoptosis (Bax dan Bak) dan anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-x, dan Mcl-1). Peningkatan protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 akan meningkatkan *cyclin* D1 yang menyebabkan progresifitas siklus sel dari fase G1 ke fase S sehingga menginduksi terjadinya replikasi DNA. Pada siklus sel kanker, *thymidylate synthase* (TS) di ekspresikan tinggi pada fase G1 melalui perantara aktivitas transkripsi dari E2F dan memicu terjadinya replikasi dari DNA pada sel kanker. Replikasi DNA menyebabkan mutasi FAK di kromosom 8q24.3 lalu terjadinya amplifikasi gen FAK dan peningkatan FAK. Ekspresi berlebih dari FAK akan meningkatkan ekspresi *cyclin* D1 dan memicu replikasi DNA kembali. FAK didalam sitoplasma akan berikatan dengan Scr sehingga mengaktifkan bentuk aktif FAK. Ikatan tersebut memicu aktivasi dari kinase dan P13K/AKT. Aktivasi kinase akan menyebabkan Mdm2 berikatan dengan p53 dan memicu terjadinya degradasi p53 sehingga akan menghambat pembentukan p21. Aktivasi sinyal transduksi P13K-AKT akan mengaktifkan NFkB dan menghambat *caspase*-3. Penghambatan oleh NFkB terhadap *caspase*-3 akan menyebabkan terjadinya anti-apoptosis pada sel kanker.

Selain meningkatkan protein *Cyclin* D₁, Bcl-2 juga memiliki peran dalam peningkatan Ca²⁺ intraseluler di sitoplasma, peningkatan Bcl-2 akan menurunkan sensitivitas mitokondria dalam pengambilan kalsium dan mencegah pelepasan

sitokrom-c dari mitokondria untuk menginduksi apoptosis. Pada kanker kolon terjadi perubahan ekspresi dan jumlah dari Ca^{2+} *channel* dan *pumps*, sebagai contohnya adalah TRPV, ORAI1, IP₃R dan SERCA. Perubahan tersebut akan menyebabkan terjadinya peningkatan Ca^{2+} di sitoplasma. Peningkatan Ca^{2+} intraseluler akan mengaktifkan protein sistein (Calpain) dalam menginduksi pembelahan FAK dan memicu aktivasi NFAT di nukleus dalam menginduksi ekspresi *cyclin D₁* kemudian terjadi proliferasi sel (Dziegielewska, 2014; Parkash and Asotra, 2010; shibao *et al*, 2010).

5-Fluourasil merupakan agen standard kemoterapi dari kanker kolon. 5-FU bekerja berikatan dengan *thymidylate synthase* (TS) sehingga merusak DNA. *Coelomic fluid* cacing tanah memiliki kandungan aktif biologi molekul dan leukosit yang berperan dalam fagositosis, enkapsulasi, dan granuloma. Beberapa protein dan peptide dengan peran sebagai anti tumor dan anti bakteri telah ditemukan di dalam *coelomic fluid*. Protein *coelomic cytolytic factor* (CCF-1) dengan berat 42 KDa dilaporkan memiliki peran dalam sitolitik, opsonisasi, dan hemolitik. Menurut penelitian Olivares *et al* (2002), mengatakan CCF-1 sebagai analog TNF. TNF akan berikatan dengan TNFR sehingga menyebabkan FADD berikatan dengan *procaspase-8*. Prokaspase-8 akan mengaktifkan kaspase-3 dan meningkatkan protein pro-apoptosis Bax dan Bak dan menghambat Bcl-2 sehingga menginduksi apoptosis. Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan Kim *et al* (2002) menyebutkan bahwa TNF dapat menginduksi apoptosis melalui supresi dari ekspresi Bcl-2. TNF juga menghambat aktivasi NF-KB melalui Akt sehingga menginduksi terjadinya apoptosis (Horssen, Hagen and Eggermont, 2006).

3.2 Hipotesis

1. Pemberian kombinasi cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dengan 5-fluorourasil dapat menurunkan persentase protein FAK pada sel HT-29 kanker kolon.
2. Pemberian cairan *coeloemic* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dengan 5-fluorouracil dapat menurunkan persentase Kalsium Intraseluler pada sel HT-29 kanker kolon.
3. Terdapat hubungan antara penurunan konsentrasi Kalsium Intraseluler dan persentase FAK dan pada sel HT-29 kanker kolon setelah pemberian kombinasi *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dan 5-FU.

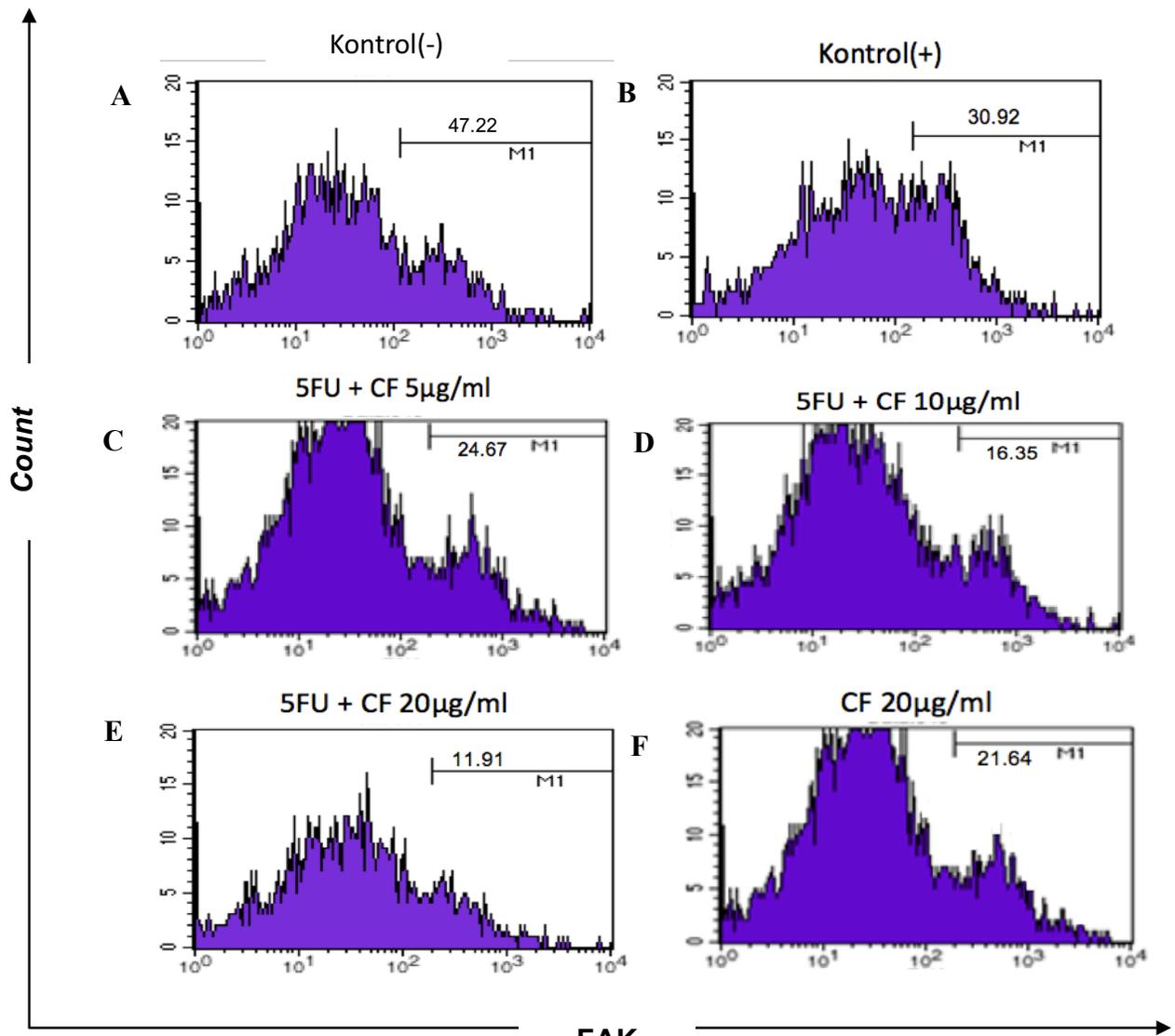
BAB V

HASIL PENELITIAN

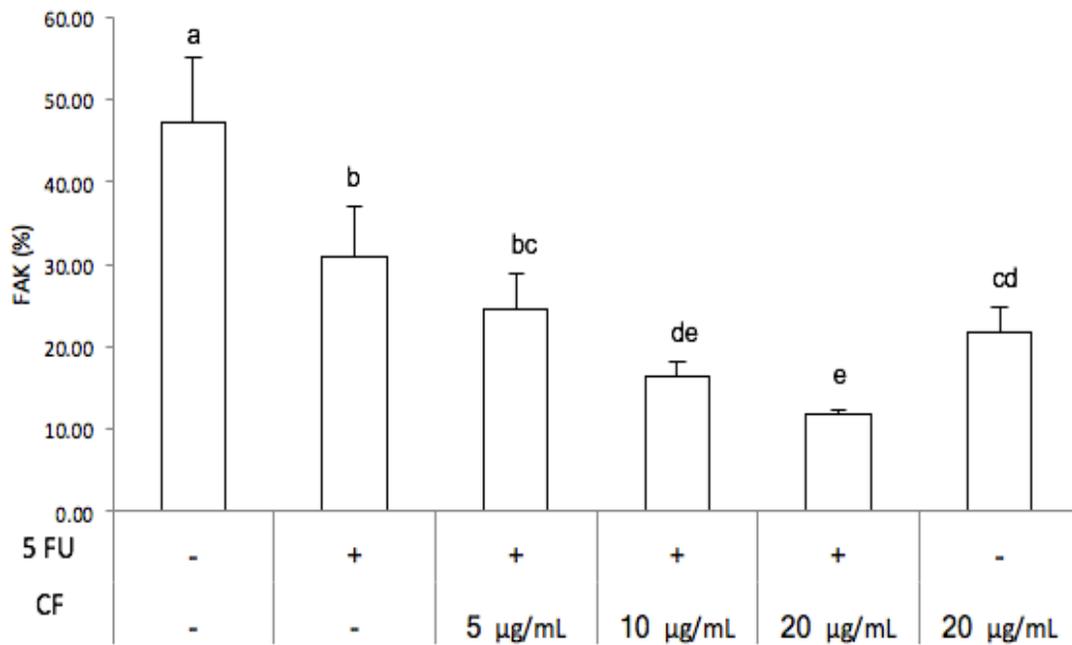
Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker kolon (sel HT-29). Kultur sel HT-29 dilakukan sebanyak 4 kali untuk mengamati efek pemberian *coelomic fluid* sebagai kombinasi terapi 5-FU terhadap jumlah Ca^{2+} intraseluler dan FAK pada sel HT-29. Pada penelitian ini, sel HT-29 dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol negatif yaitu kelompok sel HT-29 tanpa diberi perlakuan. Kelompok kedua merupakan kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan dengan pemberian 5-FU dosis 5 μ g/ml. Kelompok ketiga merupakan kelompok perlakuan I (P1) dengan pemberian 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 5 μ g/ml. Kelompok keempat merupakan kelompok perlakuan II (P2) dengan pemberian 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 10 μ g/ml. Kelompok kelima merupakan kelompok perlakuan III (P3) dengan pemberian 5-FU dosis 5 μ g/ml dan *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml. Kelompok keenam merupakan kelompok perlakuan IV (CF) dengan pemberian *coelomic fluid* dosis 20 μ g/ml. Sel HT-29 diberikan perlakuan setelah *confluent* dengan kepadatan sebesar 70%-80%. Pada penelitian ini, pemberian perlakuan menggunakan *coelomic fluid* dan 5-FU pada sel HT-29 dikerjakan dalam waktu 24 jam. Selanjutnya akan dipanen untuk dianalisa hasilnya menggunakan metode *flowcytometry* atau *imunofluorescence*.

5.1 Efek *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* terhadap persentase jumlah protein FAK pada sel HT-29

Analisa jumlah persentase FAK pada sel kanker kolon HT-29 dengan pemberian 5-FU dan *coelomic fluid* pada berbagai konsentrasi dilakukan menggunakan flowsitometri.



Gambar 5.1 Hasil pemeriksaan persentase protein FAK sel kanker kolon menggunakan Flowsitometri. (A) Tanpa perlakuan (kontrol negatif), (B) pemberian 5-FU (kontrol positif), (C) Perlakuan I, (D) Perlakuan II, (E) Perlakuan III, (F) Perlakuan IV.



Gambar 5.2 Grafik Perbandingan Persentase Jumlah Protein FAK berdasarkan kelompok yang Dipapar dengan 5-FU dan Berbagai Dosis *Coelomic fluid* : tanpa perlakuan (kontrol negatif), 5FU (kontrol positif), 5-FU dan 5µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan 1), 5-FU dan 10µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan 2), 5-FU dan 20µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan 3), dan 20µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan 4). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna, $p < 0.05$.

Hasil grafik dari flowsitometri menunjukkan rerata persentase protein FAK pada tiap kelompok perlakuan. Rerata persentase protein FAK tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol negatif sedangkan rerata persentase protein FAK terendah didapatkan pada kelompok P3. Untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way Anova* yang dilanjutkan dengan *Post-Hoc LSD*.

Sebelum melakukan uji *One-way Anova*, langkah pertama yang harus dilakukan adalah melihat data apakah terdistribusi normal dan homogen. Pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 24. Dari uji tersebut, didapatkan signifikansi lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) berarti bahwa data yang diperoleh memiliki distribusi normal. Selanjutnya

melihat data yang diperoleh apakah homogen atau tidak dengan melihat *homogeneity of variances*. Hasil yang didapat adalah $p > 0.05$ yang berarti data homogen. Dari kedua uji tersebut dapat disimpulkan bahwa data persentase protein FAK terdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik One-Way Anova terpenuhi.

Hasil uji *One-Way Anova* terhadap persentase protein FAK menunjukkan nilai $p=0.000$. Hal ini menerangkan terdapat minimal dua kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Uji *post-hoc multiple comparisons* dilakukan selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Dari hasil *uji post-hoc LSD multiple comparisons* didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan semua kelompok ($p=0.00$). Hal ini menerangkan bahwa pemberian terapi dapat menurunkan jumlah protein FAK dibandingkan pada kelompok tanpa perlakuan. Perbedaan yang signifikan juga ditunjukkan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok CF (30.92 ± 6.12 vs. 21.64 ± 3.27 ; $p=0.012$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *coelomic fluid* dosis $20\mu\text{g/ml}$ lebih dapat menurunkan jumlah protein FAK dibandingkan dengan pemberian 5-FU dosis $5\mu\text{g/ml}$. Dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, kelompok P2 (30.92 ± 6.12 vs. 16.35 ± 1.82 ; $p=0.00$), dan kelompok P3 (30.92 ± 6.12 vs. 11.91 ± 0.51 ; $p=0.00$) berbeda signifikan, namun kelompok kontrol positif dengan P1 (30.92 ± 6.12 vs. 24.67 ± 4.23 ; $p=0.076$) tidak berbeda secara signifikan. Ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* lebih efektif dibandingkan pemberian dengan 5-FU saja. Akan tetapi pemberian kombinasi 5-FU dengan *coelomic fluid* dosis $5\mu\text{g/ml}$ tidak berbeda secara bermakna dengan pemberian 5-FU saja.

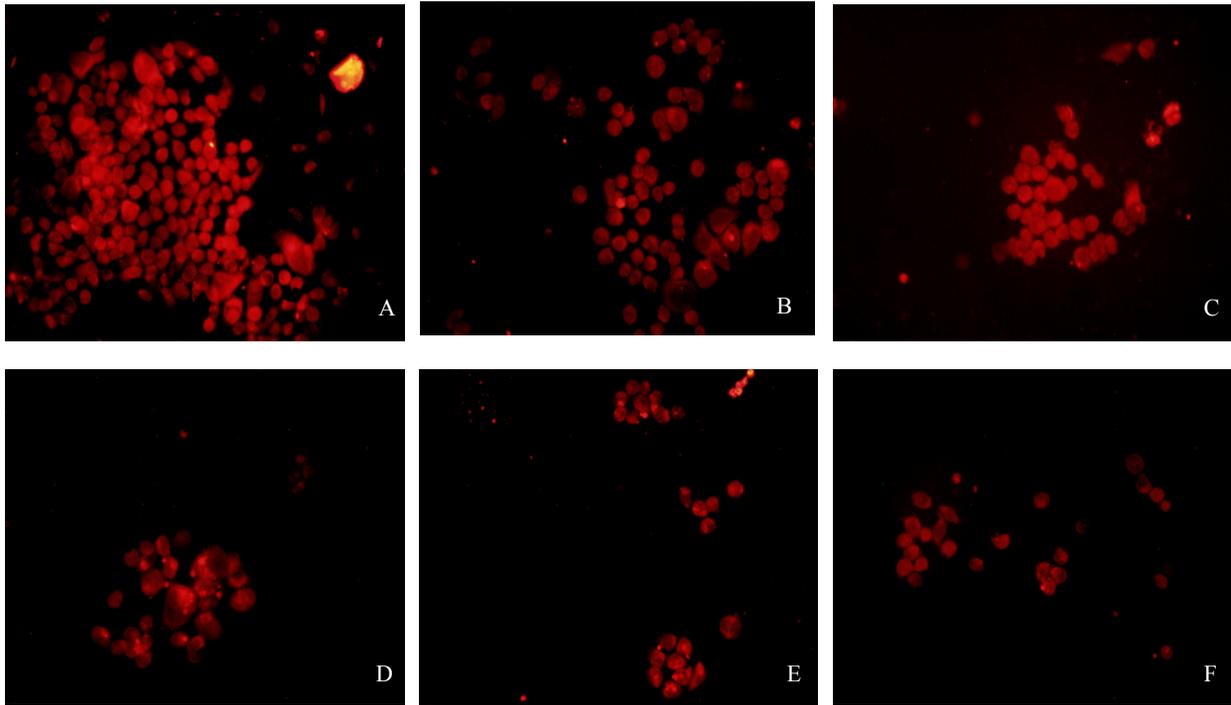
Penurunan jumlah persentase protein FAK ditemukan bermakna pada kelompok P3 (11.91 ± 0.51 vs. 21.64 ± 3.27 ; $p=0.009$) dibandingkan dengan kelompok CF. Hal ini menerangkan bahwa kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* lebih baik dari pada

pemberian *coelomic fluid* saja, namun dibandingkan dengan kelompok P1 (24.67 ± 4.23 vs. 21.64 ± 3.27 ; $p=0.372$) dan P2 (16.35 ± 1.82 vs. 21.64 ± 3.27 ; $p=0.129$), kelompok CF tidak berbeda signifikan. Ini membuktikan bahwa pemberian kombinasi 5-FU dengan *coelomic fluid* dosis $5\mu\text{g/ml}$ atau $10\mu\text{g/ml}$ sama efektifnya dengan pemberian *coelomic fluid* dosis $20\mu\text{g/ml}$ saja.

Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid*, dan pemberian *coelomic fluid* saja mampu menekan jumlah protein FAK. Namun kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dosis $10\mu\text{g/ml}$ merupakan dosis terbaik untuk menurunkan jumlah protein FAK pada sel HT-29 kanker kolon. Dari penjelasan tersebut, disimpulkan bahwa hipotesis pertama penelitian telah terbukti.

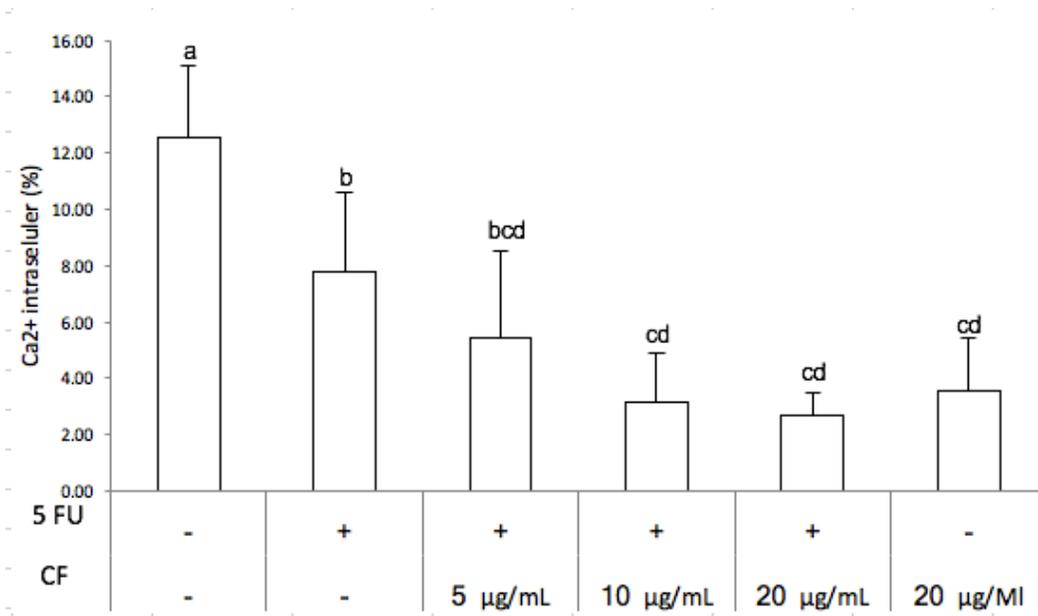
5.2 Efek *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* terhadap persentase jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29

Pada penelitian ini juga ingin mengetahui pemberian *coelomic fluid* sebagai agen kombinasi 5-FU apakah memiliki efek terhadap jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel kanker kolon HT-29. Ca^{2+} intraseluler pada berbagai kelompok sel dilakukan analisa menggunakan imunofluoresen.



Gambar 5.3 Tampilan Ekspresi Ca²⁺ intraseluler dengan mikroskop fluorezen.
Keterangan: A merupakan kelompok kontrol negatif, B merupakan kelompok kontrol positif, C merupakan kelompok P1, D merupakan kelompok P2, E merupakan kelompok P3, dan F merupakan kelompok CF.

Sebelum dilakukan analisa data jumlah Ca²⁺ intraseluler dengan uji statistik, pada setiap perlakuan dihitung rerata tiap kelompok. Rerata persentase Ca²⁺ intraseluler tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol negatif sedangkan rerata persentase Ca²⁺ intraseluler terendah didapatkan pada kelompok P3. Untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan, dilakukan analisis uji beda *One-way Anova* yang dilanjutkan dengan *Post-Hoc LSD*.



Gambar 5.4 Grafik Perbandingan Persentase Jumlah Ca^{2+} intraseluler berdasarkan kelompok yang Dipapar dengan 5-FU dan Berbagai Dosis *Coelomic Fluid* : tanpa perlakuan (kontrol negatif), 5FU (kontrol positif), 5-FU dan 5µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan I), 5-FU dan 10µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan II), 5-FU dan 20µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan III), dan 20µg/ml *coelomic fluid* (perlakuan IV). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna, $p < 0.05$.

Sebelum melakukan uji statistik, langkah pertama yang harus dilakukan adalah melihat data apakah terdistribusi normal dan homogen. Pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 24 ($n \leq 50$). Dari uji normalitas, didapatkan nilai lebih besar dari 0.05 ($p > 0.05$) menerangkan bahwa data yang diperoleh memiliki distribusi normal. Selanjutnya melihat data yang diperoleh apakah homogen atau tidak dengan melihat *homogeneity of varians* nya. Hasil yang didapat adalah $p > 0.05$ menerangkan bahwa data homogeny, kemudian dilakukan uji *One-Way Anova*.

Hasil uji *One-Way Anova* Ca^{2+} intraseluler terhadap kelompok menunjukkan nilai $p = 0.00$ ($p < 0.05$). Hal ini menerangkan bahwa terdapat minimal dua kelompok yang memiliki perbedaan bermakna kemudian, untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan, dilakukan uji *post hoc* LSD. Dari hasil uji *post-hoc* LSD *multiple*

comparisons didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok lainnya ($p < 0.05$). Hal ini menerangkan bahwa pemberian terapi dapat menekan jumlah persentase Ca^{2+} intraseluler dibandingkan kelompok tanpa perlakuan. Perbedaan yang signifikan juga ditunjukkan antara kelompok kontrol positif dengan CF (7.75 ± 2.86 vs. 3.58 ± 1.83 ; $p = 0.018$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *coelomic fluid* dengan dosis $20 \mu\text{g/ml}$ lebih menurunkan jumlah persentase Ca^{2+} intraseluler dibandingkan dengan pemberian 5-FU dosis $5 \mu\text{g/ml}$. Dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, kelompok P2 (7.75 ± 2.86 vs. 3.18 ± 1.72 ; $p = 0.011$), dan kelompok P3 (7.75 ± 2.86 vs. 2.69 ± 0.78 ; $P = 0.006$) berbeda secara bermakna, namun dengan kelompok P1 (7.75 ± 2.86 vs. 5.44 ± 3.11 ; $p = 0,169$) tidak berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian 5-FU saja tidak berbeda bermakna dengan kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dosis $5 \mu\text{g/ml}$.

Penurunan persentase Ca^{2+} intraseluler pada kelompok CF dibandingkan dengan kelompok P1 (3.58 ± 1.83 vs. 5.44 ± 3.11 ; $p = 0.262$), P2 (3.58 ± 1.83 vs. 3.18 ± 1.72 ; $p = 0.808$), dan P3 (3.58 ± 1.83 vs. 2.69 ± 0.78 ; $p = 0.589$) tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *coelomic fluid* dosis $20 \mu\text{g/ml}$ sudah dapat menurunkan jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29. Namun, kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* tetap dapat memberikan efek penurunan pada Ca^{2+} intraseluler yang lebih baik dibandingkan hanya pemberian *coelomic fluid* dosis $20 \mu\text{g/ml}$ meskipun tidak signifikan. Hal ini ditunjukkan pada penurunan Ca^{2+} intraseluler dibandingkan kelompok negative (Gambar 5.3). Kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dosis $10 \mu\text{g/ml}$ merupakan dosis terbaik untuk menurunkan jumlah protein FAK pada sel HT-29 kanker kolon. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa hipotesis kedua penelitian terbukti, yaitu pemberian *coelomic fluid* sebagai agen kombinasi 5-fluorouracil dapat menurunkan jumlah Kalsium Intraseluler pada sel HT-29.

5.3 Hasil Uji Korelasi Pearson

Setelah dilakukan uji *One-way Anova* dan *post-hoc LSD multiple comparisons*, kemudian dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk melihat hubungan antara protein FAK dan Ca^{2+} intraseluler. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan hasil signifikan dengan nilai $p = 0.00$ ($p < 0.05$) dan nilai koefisien korelasi $r = 0.773$ yang menunjukkan korelasi positif dengan tingkat korelasi kuat. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa protein FAK dan Ca^{2+} intraseluler memiliki hubungan kuat.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Efek Pemberian *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* terhadap persentase jumlah protein FAK pada sel HT-29

Focal Adhesion Kinase (FAK) merupakan protein non reseptor tirosin kinase yang dapat diaktifkan apabila terjadi interaksi dengan integrin, reseptor sitokin, *Growth Factor* Reseptor dan *G Protein- Coupled* Reseptor (Yoon et al, 2014). Protein FAK diekspresikan berlebih pada berbagai jenis kanker, meliputi kanker ovarium, serviks, ginjal, paru-paru, otak, kolon, payudara dan kulit (Golubovsky et al, 2009). Baru-baru ini protein FAK digunakan sebagai target terapi untuk kanker. Selain kanker, penghambatan pada FAK dapat menghasilkan manfaat klinis untuk patologi vaskular seperti edema dan peradangan. Penghambatan FAK dapat mencegah metastasis tumor, dapat meningkatkan pemberian obat kemoterapi, dan dapat membantu mengatasi resistensi kemo pada pasien (Sulzmaier et al., 2014).

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, pemberian *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu menurunkan jumlah protein FAK pada sel HT-29 kanker kolon. Penurunan protein FAK yang bermakna didapatkan pada kelompok yang diberikan perlakuan *coelomic fluid* dosis 20 µg/ml dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif ($p= 0.00$, dan $p=0.012$). Walaupun peran pemberian *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dalam pengobatan kanker kolon belum pernah dilaporkan, penelitian lain yang dilakukan oleh Dinesh, et al (2013) menunjukkan bahwa *coelomic fluid* cacing tanah *Eudrilus eugeniae* memiliki efek sitotoksik pada sel kanker kolon. Pemberian *coelomic fluid* cacing tanah *Eisenia fetida* dosis 10 µg/ml

dibuktikan juga mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel Hela secara in vitro (Yanqin, 2007).

Pada kanker kolon terjadi mutasi APC sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan protein cyclin D1. Peningkatan protein tersebut akan memicu terjadinya progresifitas dari siklus sel dan replikasi DNA pada sel kanker (Ficari *et al.* 2000). Replikasi DNA pada sel kanker akan menyebabkan peningkatan FAK (Sundaramoorthy *et al.* 2015). Proses aktivasi FAK dalam menginduksi kanker juga diperankan oleh Scr. Ikatan FAK-Scr akan mengaktifkan FAK *kinase-independent*. Aktivitas FAK *kinase-independent* dikaitkan dengan FAK FERM subdomain F1 dan didasarkan pada NLS di subdomain F2, dan subdomain F3 dikaitkan dengan Mdm-2. Peningkatan mdm-2 akan meningkatkan fungsinya dalam mendegradasi p53 (Lim, *et al.* 2012). Ekspresi berlebih FAK pada kanker juga akan meningkatkan *cyclin* D1 dan *cyclin* E, sebaliknya akan menurunkan ekspresi protein p27 dan p21 penghambat CDK sehingga memicu terjadinya progresifitas siklus sel pada kanker (Tai, *et al.* 2015). Ikatan FAK-Scr juga akan mengaktifkan sinyal transduksi PI3K-AKT dan menyebabkan ekspresi dari IAPs yang dimediasi oleh NF-kB. NF-kB akan berikatan dengan caspase-3 sehingga tidak terjadi apoptosis (Sonoda, *et al.* 2000). Penghambatan FAK dengan molekul kecil muncul sebagai kemoterapi yang menjanjikan, karena penghambatan FAK pada mencit mencegah pertumbuhan tumor, metastasis, permeabilitas vaskular dan angiogenesis (Bagi, *et al.* 2009).

Pada penelitian yang dilakukan Hua, *et al* (2011) dilaporkan bahwa *coelomic fluid* dari cacing tanah *Eisenia foetida* mengandung beberapa protein yang memiliki komponen sebagai anti tumor. Salah satu protein dengan berat 43 KDa yaitu *coelomic cytolytic factor-1* (CCF-1) dilaporkan memiliki peran dalam sitolitik, opsonisasi, dan hemolitik (Cui, *et al.* 2001). Pada tahun 1995, Bilej *et al*, melakukan

penelitian mengenai identifikasi protein CCF-1 dari *coelomic fluid* cacing tanah *Eisenia foetida*. Pada penelitiannya, ditemukan bahwa CCF-1 memiliki aktivitas sitolitik pada sel line L929 yang sensitif terhadap fungsi TNF. Dari penjelasan tersebut, dapat disimpulkan bahwa CCF-1 merupakan analog dari TNF yang berarti CCF-1 memiliki fungsi yang sama dengan TNF.

Tumor Necrosis Factor (TNF) merupakan sitokin multifungsi yang berperan dalam berbagai kegiatan seluler seperti kelangsungan hidup sel, proliferasi, diferensiasi, dan kematian. Kemudian Bilej *et al*, (2001) melakukan penelitian mengenai CCF-1 sebagai analog TNF memiliki peran dalam mekanisme pertahanan terhadap bakteri gram negatif dan positif. Penelitian yang dilakukan Olivares *et al* (2002) juga menyatakan bahwa CCF-1 cacing tanah *Eisenia foetida* sebagai analog TNF dapat melisis *Trypanosoma cruzi*.

Pada kanker, TNF memiliki dua fungsi. Salah satu fungsinya sebagai penyebab kematian sel kanker (Wan & Lin, 2008). Meskipun mekanisme kerja CCF-1 sebagai analog TNF dalam menurunkan persentase protein FAK belum pernah dilaporkan. Salah satu proses yang diduga merupakan cara kerja *coelomic fluid* dalam menurunkan persentase FAK adalah melalui penghambatan *cyclin-dependent kinases* (CDK). Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan Belizario *et al*. (1999), menunjukkan peran TNF dalam menginduksi apoptosis melalui *cyclin-dependent kinases* (CDK) secara *in vitro*. Pada penelitiannya menjelaskan bahwa pemberian TNF dosis 1-100 ng/ml dapat menghambat aktivitas CDK pada sel line WEHI, L929 dan HeLa S3. Penurunan jumlah CDK akan menurunkan jumlah FAK, sehingga akan menghambat PI3K-AKT dalam menginduksi NF-KB, sehingga akan memicu terjadinya apoptosis sel kanker (Bezzi *et al*. 2003; Wu *et al*. (2017)). Pada penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al* (2002) juga menyebutkan bahwa TNF dapat

menekan ekspresi dari bcl-2 dan menginduksi apoptosis. Penghambatan bcl-2 akan menekan ekspresi dari cyclin D1. Pada kanker kolon, peningkatan berlebih dari bcl-2 akan meningkatkan ekspresi dari protein cyclin D1 (Lin *et al.*, 2001) dan menyebabkan peningkatan FAK. Peningkatan FAK ini juga akan meningkatkan ekspresi dari cyclin D₁ (Zhao *et al.*, 2001).

Menariknya kombinasi FAK *inhibitors* dengan obat atau agen sitotoksik akan meningkatkan aktivitas dalam menargetkan penghambatan proliferasi sel kanker yang dipicu oleh agen kemoterapi (Bagi, *et al.* 2009). Pada kanker kolon, 5-fluorouracil (5-FU) merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon di seluruh dunia, baik sendiri atau dalam kombinasi dengan agen kemoterapi lainnya (Lim *et al.*, 2007). 5-Fluorouracil (5-FU) merupakan agen anti-metabolit yang bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis atau dengan masuk ke dalam makromolekul seperti DNA dan RNA, dan menghambat sintesis nukleotida enzim *thymidylate synthase* (TS) (Hedbrant *et al.* 2015). 5-FU bekerja pada saat siklus sel terjadi, dengan membatasi ketersediaan dari timidilat (Zhang *et al.*, 2008). 5-FU di dalam sel dipecah menjadi tiga bentuk metabolit aktif; *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). Bentuk aktif metabolit tersebut merusak sintesis RNA dan fungsi dari *thymidylate synthase* (TS). Dalam menghambat kerja TS, FdUMP bentuk aktif metabolit akan berikatan dengan subunit nukleotida dari TS. FdUMP kemudian membentuk kompleks terners stabil dengan CH₂THF sehingga menghambat pengikatan substrat normal dUMP dan menghambat sintesis dTMP untuk mengaktifkan dTTP dalam replikasi DNA (Longley *et al.* 2003). Pada kanker kolon stadium lanjut tingkat pasien dengan pemberian dosis single 5-FU masih hanya mencapai 10-15%, dan kombinasi 5-FU dengan obat anti-tumor lainnya hanya

memperbaiki tingkat respons hingga 40-50% (Zhang *et al.* 2008). Oleh karena itu, dibutuhkan strategi pengobatan baru untuk meningkatkan efektifitas dari pemberian 5-FU.

Studi yang dilakukan oleh Wheelhouse *et al* (2003) menyatakan bahwa TNF dapat menyebabkan kerusakan dari DNA pada kanker hepatoseluler melalui induksi protein tumor supresor p53. Kerusakan DNA yang dipicu oleh TNF akan meningkatkan efek dari agen kemoterapi. Pada penelitian yang dilakukan Wu *et al.* (2017) menunjukkan bahwa pemberian TNF- α meningkatkan efek sitotoksik dari agen kemoterapi pada sel kanker payudara. Hal ini menunjukkan bahwa *coelomic fluid* sebagai analog TNF dapat meningkatkan efek dari agen kemoterapi, seperti 5-FU. Hal tersebut dibuktikan pada penelitian ini, bahwa pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dosis 10 $\mu\text{g/ml}$, dan 20 $\mu\text{g/ml}$ dapat menurunkan persentase FAK secara bermakna ($p=0.00$, dan $p=0.00$) dibandingkan dengan 5-FU dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ saja.

Dalam fungsinya sebagai pro-apoptosis, TNF menghambat FAK dengan cara menginduksi *caspase-8* untuk mengaktifkan pro *caspase-3* menjadi *caspase-3*. Peningkatan *caspase-3* akan menghambat pembentukan NF- κB melalui PI3K-AKT (Horssen, *et al.* 2006). Beberapa jenis eksperimental juga telah dilakukan untuk mengetahui efek TNF dalam menyebabkan kematian sel. Beberapa agen meliputi bahan alami dan obat-obatan dapat menginduksi TNF dalam menghambat aktivasi dari NF- κB . Kombinasi agen pengobatan dengan TNF menyebabkan efek sitotoksik yang sinergis pada sel tumor (Wang *et al.* 2008).

Beberapa bukti ilmiah tersebut merupakan dugaan yang paling mungkin mengenai mekanisme *coelomic fluid* cacing tanah *Lumbricus rubellus* dalam menurunkan jumlah protein FAK. Mekanisme sesungguhnya bagaimana *coelomic fluid* menurunkan jumlah protein FAK masih belum dapat dipastikan sehingga

penelitian lanjutan masih perlu dilakukan untuk memastikan cara kerja *coelomic fluid* dalam menurunkan jumlah protein FAK.

6.2 Efek Pemberian *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* terhadap persentase jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29

Selain membuktikan peran *coelomic fluid* terhadap protein FAK pada sel kanker kolon, penelitian ini juga ingin membuktikan peran pemberian *coelomic fluid* terhadap penurunan jumlah Ca^{2+} intraseluler. Ca^{2+} intraseluler merupakan *second messenger* dan berperan dalam fungsi fisiologi sel, meliputi ekspresi gen, mengatur siklus sel, motilitas sel, migrasi dan apoptosis (Berridge *et al*, 2003). Pada saat sel istirahat, konsentrasi kalsium intraseluler ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) diatur kurang lebih 100 nM, sedangkan konsentrasi kalsium ekstraseluler lebih tinggi, antara 1-2 mM (Machaca, 2011). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler yang terus-menerus akan menjadi racun dan memicu kematian sel (McConkey, 1997). Pada kanker terjadi perubahan homeostasis dari Kalsium. Homeostasis Kalsium diatur oleh protein membran, yaitu *Ca²⁺ channel*, ATPase, dan *exchangers*. Adanya perubahan protein tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan Ca^{2+} intraseluler di sitosol (Monteith *et al*. 2007).

Pada penelitian ini membuktikan bahwa pemberian *coelomic fluid* mampu menurunkan jumlah Ca^{2+} intraseluler pada sel HT-29 kanker kolon. Penurunan Ca^{2+} intraseluler yang bermakna didapatkan pada kelompok yang diberikan perlakuan *coelomic fluid* dosis 20 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif ($p= 0.00$, dan $p=0.018$). Walaupun peran pemberian *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dalam menurunkan Ca^{2+} intraseluler pada pengobatan kanker kolon belum pernah dilaporkan, penelitian lain yang dilakukan oleh Dinesh, *et al* (2013) menunjukkan bahwa *coelomic fluid* cacing tanah *Eudrilus eugeniae* memiliki

efek sitotoksik pada sel kanker kolon. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yamaji *et al* (2003) juga menyebutkan bahwa *coelomic fluid* dari cacing tanah *Eisenia fetida* memiliki beberapa protein dan peptida yang berperan sebagai anti-tumor dan anti bakteri. Salah satu protein yang terkandung dalam *coelomic fluid* adalah *Coelomic Cytolytic Factor-1 (CCF-1)*. Sebagai analog TNF, CCF-1 pada invertebrata disekresikan oleh *coelomocytes*. Sedangkan pada mamalia, TNF disekresikan oleh makrofag (Bilej *et al.* 1995). Pada penelitian yang telah dilakukan, pemberian antibodi monoklonal memberikan reaksi terhadap domain TNF seperti lektin yang juga bereaksi terhadap CCF-1 dan begitu sebaliknya, antibodi monoklonal yang melawan CCF-1 bereaksi juga terhadap TNF (Magez *et al.* 1997). Pemberian CCF-1 sebagai analog TNF juga menunjukkan efek sitotoksik pada *Trypanosoma cruzi* (Olivares Fontt *et al.* 2002).

Meskipun mekanisme kerja CCF-1 sebagai analog TNF dalam menurunkan Ca^{2+} intraseluler belum pernah dilaporkan. Salah satu proses yang diduga merupakan cara kerja *coelomic fluid* sebagai analog TNF adalah dengan menghambat protein Bcl-2. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al* (2002) menunjukkan bahwa TNF dapat menekan ekspresi dari bcl-2 dan menginduksi apoptosis. Bcl-2 merupakan protein yang diketahui memiliki aktivitas anti-apoptosis. Peningkatan protein Bcl-2 pada kanker akan menurunkan ekspresi dari protein pro-apoptosis (Bax atau Bak) yang dapat mencegah apoptosis sel melalui modulasi sinyal Ca^{2+} intraseluler (Rong dan Distelhorst, 2008). Overekspresi dari bcl-2 akan mengakibatkan terjadinya peningkatan Ca^{2+} intraseluler di sitoplasma, menurunkan sensitivitas mitokondria dalam pengambilan kalsium dan mencegah mitokondria mengeluarkan sitokrom c dan menghambat aktivitas dari kaspase (Parkash & Asotra, 2010; Lin *et al.*, 2001).

Peningkatan Ca^{2+} intraseluler di sitosol juga dipengaruhi dari perubahan ekspresi atau aktivitas dari Ca^{2+} *channels* dan *pumps* (Monteith et al. 2007). Salah satu contohnya adalah terjadinya perubahan aktivitas IP_3R dan/atau perubahan dari profil ekspresi IP_3R telah ditemukan di sejumlah jenis sel kanker kanker. Menurut penelitian yang dilakukan Cui *et al* (2017) menunjukkan bahwa pada sampel glioblastoma manusia terjadi penurunan $\text{IP}_3\text{R1}$ dan peningkatan $\text{IP}_3\text{R3}$ dibandingkan dengan sel normal. Pelepasan Ca^{2+} yang dimediasi oleh $\text{IP}_3\text{R3}$ menyebabkan migrasi sel glioblastoma yang dikultur dan meningkatkan kelangsungan hidup rata-rata pada mencit model xenograft glioblastoma (Kang et al, 2010). Dalam penelitian klinis yang dilakukan oleh Shibao dan kawan-kawan, melaporkan bahwa ekspresi isoform IP_3 dikaitkan dengan perkembangan kanker kolorektal dengan menggunakan jaringan karsinoma kolorektal yang dibedah saat operasi pada seratus pasien. Mereka menemukan bahwa reseptor $\text{IP}_3\text{R1}$ dan $\text{IP}_3\text{R2}$ di ekspresikan pada mukosa normal kolorektal dan kanker kolorektal, sedangkan $\text{IP}_3\text{R3}$ hanya ditemukan pada kanker kolon, terutama pada keadaan invasi yang sudah jauh, metastasis ke getah bening, metastasis ke hati, dan pada stadium TNM yang tinggi (shibao et al, 2010).

Selain IP_3R , pada kanker juga terjadi perubahan dari SERCA. SERCA merupakan anggota Ca^{2+} -ATPases yang terbaik dan bertanggung jawab dalam pengisian Ca^{2+} di ER. Mutasi dan perubahan ekspresi dari isoform SERCA telah diidentifikasi pada berbagai jenis kanker, seperti kanker kolon, lambung, paru-paru, myeloid leukemia dan tumor plexus choroid (Brouland *et al*, 2005). Pada sel kanker kolorektal, SERCA3 dilaporkan telah hilang secara progresif selama proses multistage dari tumorigenesis kolon setelah ekspresi meningkat pada awal selama diferensiasi sel (Brouland et al, 2005). Pada penelitian yang dilakukan arbabian *et al* (2011), ekspresi dari SERCA3 di sel kanker adenokarsinoma kolon hampir tidak terdeteksi

atau hilang dibandingkan dengan ekspresi SERCA 3 pada sel kolon normal dengan pengecatan imunohistokimia.

Pada penelitian yang dilakukan Wu *et al.* (2017) menunjukkan bahwa pemberian TNF- α meningkatkan efek sitotoksik dari agen kemoterapi pada sel kanker payudara. Pada penelitiannya menyebutkan bahwa kombinasi TNF- α dengan 5-FU menginduksi puncak sub G0/G1, hal ini menunjukkan induksi nekrosis dan/atau apoptosis mungkin disebabkan sensitisasi 5-FU yang diinduksi TNF. Hal ini menunjukkan bahwa sebagai analog TNF, *coelomic fluid* dapat meningkatkan efek dari agen kemoterapi, seperti 5-FU. Pada penelitian ini dibuktikan dengan pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dengan dosis 10 μ g/ml dan 20 μ g/ml dibandingkan dengan pemberian 5-FU saja berbeda secara signifikan ($p=0.011$; $p=0.006$) dalam menurunkan persentase Kalsium Intraseluler.

6.3 Korelasi antara Focal Adhesion Kinase dengan Ca²⁺ intraseluler

Hasil analisis korelasi secara statistik antara FAK dan Kalsium Intraseluler menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.00 ($p<0.00$) yang berarti bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara FAK dan Kalsium Intraseluler pada sel kanker HT-29. Menurut Giannone, *et al* (2004) pada penelitiannya juga menyebutkan bahwa ada hubungan antara FAK dan Ca²⁺ intraseluler. Peningkatan Ca²⁺ akan menyebabkan terjadinya peningkatan dan aktivasi dari FAK sehingga terjadi pembelahan FAK. Pembelahan dari FAK akan memicu perpindahan domain FAK FERM menuju nukleus dan menyebabkan degradasi dari p53 (Lim *et al*, 2008). Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sundaramoorthy *et al* (2015) yang menunjukkan bahwa terjadinya peningkatan Ca²⁺ akan menginduksi pembelahan FAK melalui calpain (Sawhney *et al*, 2006).

6.4 Keunggulan dan Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memberikan informasi terbaru bahwa pemberian *coelomic fluid* sebagai agen kombinasi dari 5-FU mampu menurunkan jumlah protein FAK dan Kalsium intraseluler pada sel HT-29 kanker kolon. Meskipun penelitian mengenai pemberian *coelomic fluid* sebagai agen kombinasi dari 5-FU mampu menurunkan jumlah protein FAK dan Kalsium intraseluler belum pernah dilakukan. Selain itu, penelitian ini juga berhasil menemukan bahwa pemberian *coelomic fluid* dalam dosis 10µg/ml sebagai kombinasi 5-FU memiliki pengaruh yang bermakna dibandingkan pemberian terapi hanya menggunakan 5-FU dosis 5 µg/ml dalam menurunkan jumlah protein FAK dan kalsium intraseluler.

Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya tidak membahas mengenai mekanisme *coelomic fluid* dalam menghambat sel kanker. Hal ini menyebabkan sedikitnya sumber dari penelitian ini dan menjadi keterbatasan penelitian kami. Oleh karena itu, menyebabkan dibukanya peluang untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut lagi bagaimana mekanisme *coelomic fluid* dalam menghambat progresifitas dari kanker.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diambil dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian kombinasi *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dan 5-FU dapat menurunkan konsentrasi Kalsium Intraseluler pada sel line kanker kolon HT-29.
2. Pemberian kombinasi *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dan 5-FU dapat menurunkan persentase protein FAK pada sel line kanker kolon HT-29.
3. Terdapat hubungan antara penurunan konsentrasi Kalsium Intraseluler dan persentase FAK dan pada sel HT-29 kanker kolon setelah pemberian kombinasi *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dan 5-FU.

7.2 Saran

Saran yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan penelitian mengenai pembuktian jalur *coelomic fluid* dalam menghambat sel kanker.
2. Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya perlu diukur jalur yang dipengaruhi oleh *coelomic fluid* dalam menurunkan jumlah Ca^{2+} intraseluler dan protein FAK pada sel kanker kolon HT-29.
3. Perlunya dilakukan pembuktian perbedaan uptake *coelomic fluid* pada FAK dan Ca^{2+} intraseluler untuk menjelaskan penyebab perbedaan respon dosis yang terjadi antara keduanya.
4. Penelitian lanjutan secara *in vivo* perlu dilakukan untuk meneliti secara

keseluruhan efek pemberian *coelomic fluid* sebagai terapi kombinasi 5-FU terhadap kanker kolon.

5. Perlu diberikan Ca^{2+} inhibitor untuk mengetahui mekanisme kerja kombinasi *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dan 5-FU dalam menurunkan FAK.