

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Terapi keganasan

Terapi keganasan pada umumnya, termasuk kanker payudara, terdiri dari 4 macam, yaitu: pembedahan, terapi radiasi, kemoterapi (termasuk terapi hormonal), serta terapi biologis (imunoterapi, agendeferensiasi, agen dengan target biologi sel kanker). Penentuan jenis terapi kanker payudara terutama yang disertai metastasis, dibutuhkan pertimbangan perlunya terapi lokal, keadaan pasien, status reseptor hormon pada tumor, pertimbangan klinis secara menyeluruh. Oleh karena terapi sistemik bersifat paliatif, maka potensi toksik terapi harus seimbang dengan tingkat respon yang diharapkan, dengan mengutamakan pencegahan terhadap komplikasi yang berbahaya dari metastasis.

Pembedahan, memiliki keuntungan seperti kontrol lokal kanker, menjaga fungsi organ, *debulking*, serta menentukan *staging* kanker yang telah meluas. Namun, dalam pembedahan, penting diperhatikan eksisi yang sempurna terhadap masa kanker dengan tetap memperhatikan daerah jaringan yang sehat, serta manipulasi seminimal mungkin untuk mencegah penyebaran, serta meminimalkan risiko operasi. Pembedahan yang dikombinasi dengan terapi adjuvan kemoterapi dan radiasi akan mendapatkan hasil yang lebih baik.

Terapi endokrin dipertimbangkan berdasarkan atas hasil pemeriksaan reseptor estrogen dan progesteron pada jaringan kanker. Tumor yang positif terhadap kedua jenis reseptor tersebut memiliki tingkat respon sampai 80%. Namun, perlu diperhatikan bahwa pemberian kombinasi agen terapi endokrin tidak memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan pemberian tunggal. Kombinasi jenis terapi ini dengan kemoterapi juga tidak bermanfaat.

Terapi radiasi merupakan terapi yang bersifat lokal, dilakukan seoptimal atau seluas mungkin terhadap jaringan kanker, tetapi dengan kerusakan minimal terhadap jaringan sehat di sekitarnya. Sementara, pemberian agen kemoterapi biasanya digunakan pada kanker yang telah mengalami metastasis untuk mengurangi atau menghambat pertumbuhan kanker. Kedua macam terapi ini bekerja dengan prinsip merusak DNA sel, yang kemudian akan mengakibatkan terjadinya apoptosis. Oleh karena itu, sel-sel kanker yang mengalami mutasi dan telah kehilangan kemampuan apoptosisnya, atau secara genetik resisten terhadap apoptosis memiliki potensi untuk tetap viabel.

Metode terapi biologi pada prinsipnya memanipulasi interaksi antara host dan kanker dengan cara meningkatkan pertahanan host terhadap kanker. Salah satu target spesifik yang dikembangkan adalah agen-agen yang mempengaruhi apoptosis seperti: antagonis *inhibitors of apoptosis protein* (IAP), aktivator kaspase, regulator anggota *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Namun, penemuan agen tetap dengan target molekuler ini membutuhkan berbagai pemeriksaan yang spesifik untuk

menentukan titik dan mekanisme kerjanya, optimalisasi kerja molekul utama, sampai dengan aplikasi *in vivo* yang nontoksik.

2.2. Sarang semut

Sarang semut merupakan salah satu tumbuhan epifit dari Rubiaceae yang dapat berasosiasi dengan semut. Secara ekologi, tumbuhan sarang semut tersebar dari hutan bakau dan pohon-pohon di pinggir pantai hingga ketinggian 2.400 m di atas permukaan laut⁹. Sekilas taksonomi dari tumbuhan sarang semut dapat dijelaskan sebagai berikut:

Divisi : *Tracheophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Subkelas : *Lamiidae*

Ordo : *Rubiales*

Famili : *Rubiaceae*

Genus : *Myrmecodia*

Species : *Myrmecodia pendens, Merr. & Perry*

Dalam uji *in vitro*, Qui Kim Tran dari University National of Hochiminch City, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun Hari Banskota menumbuhkan 3 sel kanker yaitu kanker serviks, kanker paru dan kanker usus dalam ekstrak etanolik sarang semut dengan berbagai pelarut seperti air, etanol, methanol, dan campuran methanol-air. Hasilnya sarang semut mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker. Para peneliti

tersebut menuturkan bahwa seluruh ekstrak etanolik sarang semut menekan proliferasi sel tumor manusia. Dalam uji itu terbukti tingkat efektivitas EC50 mencapai 9,97 mg/ml pada ekstrak etanolik methanol. Artinya hanya dengan dosis kecil 9,97 mg/ml, ekstrak etanolik sarang semut mampu menekan 50% laju pertumbuhan sel kanker. Sedangkan EC50 pada ekstrak etanolik air 22,3 mg/ml; campuran methanol-air 11,3 mg/ml.^{10,12} Dalam segi keamanan, riset ilmiah yang telah dilakukan oleh Muhammad Ahkam Subroto, membuktikan, konsumsi 3 kali 1 sendok makan sarang semut per hari masih sangat aman. Hasil riset tersebut mendapati angka LD50 sarang semut amat tinggi sehingga keamanan konsumen terlindungi.⁹

Uji penapisan kimia dari tumbuhan sarang semut menunjukkan bahwa tumbuhan ini mengandung senyawa aktif dari golongan flavonoid dan tanin.^{10,12}

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam *herbal medicine* mempunyai efek memblokir reseptor faktor pertumbuhan, dan menghambat Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), pada jalur sinyal Receptor Tirosin Kinase (RTKs).^{8,9,10,11,12,13} Pada penelitian yang dilakukan oleh Hiroko Deguchi dkk, menyimpulkan bahwa senyawa flavonoid terkandung dalam herbal medicine (teh hijau) mempunyai efek penghambat pertumbuhan pada sel kanker payudara (sel T47D). Mekanisme inhibisi pertumbuhan tersebut terutama pada MAPK¹², di mana MAPK akan memfosforilasi berbagai protein termasuk *transcription factor* yang dibutuhkan pada sintesa protein dalam differensiasi dan siklus sel. Flavonoid dilaporkan mempunyai kemampuan

untuk menghambat aktivasi Nuclear Factor Kappa B (NF-KB), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin.^{8,10} Pada penelitian yang dilakukan Tazulakhova dari Moscow, dilaporkan bahwa flavonoid alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- ($\text{IFN-}\gamma$) dalam suatu populasi immunosit¹⁵.

2.3. Aktifitas Proliferasi sel

Perubahan yang terjadi pada awal progresifitas sel normal menjadi sel kanker adalah peningkatan proliferasi sel.¹⁹ Progresifitas sel neoplastik merupakan cermin dari sifat dan perangai sel yang telah berubah menjadi maligna. Sel sel kanker yang tumbuh berlebihan terjadi akibat proses aktifitas proliferasi sel yang berlebih-lebihan.^{19,20} Kenaikan aktifitas proliferasi pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prakanker.^{19,20}

Aktifitas proliferasi sel pada lesi sel jinak maupun ganas dapat diteliti dengan thymidin uptake, pemberian label bromodeoxy-uridine, sitometrik alur maupun imunohistokimia misalnya ki-67, PCNA maupun MIB-1.^{19,20}

2.4. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatik intraseluler. Enzym, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa

phospholipid pada membran selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag^{31,32}.

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah agent kemoterapi, ultraviolet/radiasi, panas, *osmotic imbalance*, dan *Nitric Oxide*. Menurut jenis trigger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis adalah apoptosis yang diinduksi oleh CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand -induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin.

Secara mikroskopik apoptosis dapat dilihat dengan pengecatan HE, sebagai *apoptotic body*, berupa sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran kromatinnya terlihat pecah-pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat *apoptotic body* terpisah dari sel-sel sekitarnya yang tidak dengan gambaran halo yang jelas³³.

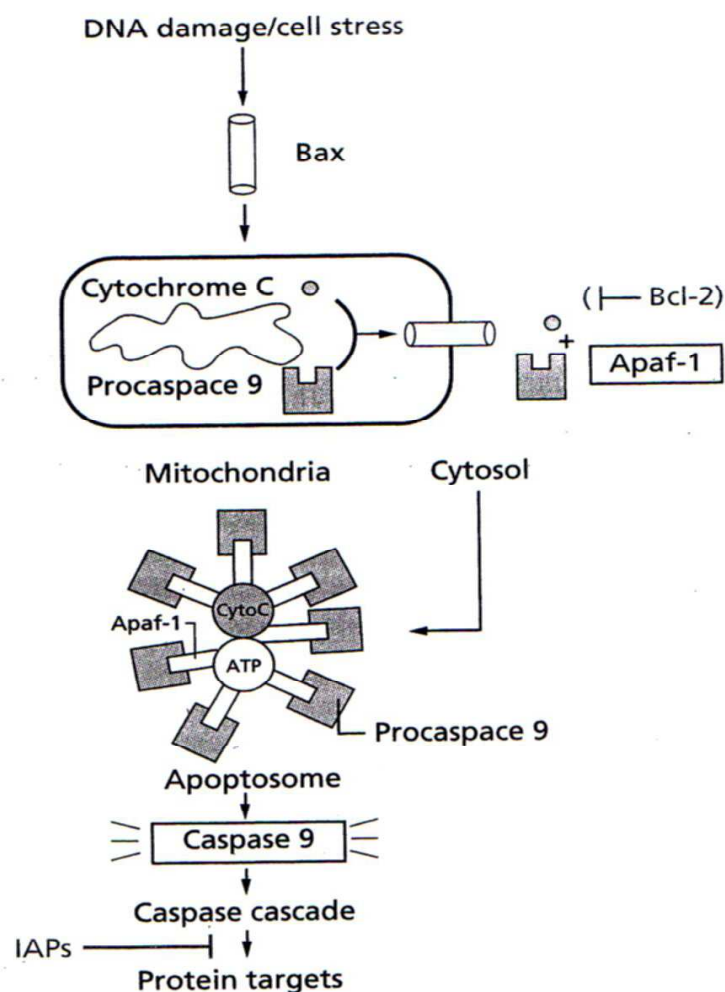
Apoptosis adalah tipe kematian sel yang terprogram melalui serangkaian perubahan struktural sebagai hasil dari rangsang fisiologis atau patologis. Ciri morfologi apoptosis adalah pengkerutan sel, penonjolan membran (*membrane blebbing*), kondensasi kromatin, dan fragmentasi inti sel. Gambaran tersebut adalah hasil dari aktivasi caspase, yaitu keluarga enzim protease yang substratnya meliputi *prekursor* enzim yang dapat menyebabkan *destruksi proteolitik* sitoskeleton dan metabolit protein yaitu *poly (adenosine-5'diphosphate-ribose) polymerase (PARP)*, *DNA-dependent protein kinase*, lamin, protein kinase, dan aktin.

Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama yaitu, jalur ekstrinsik atau *death receptor* (DR) dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria.

Jalur apoptosis melalui *Death receptor* dimulai dengan aktivasi *tumour necrosis factor receptor* (TNFR), yang meliputi Fas, *death receptor* (DR) 4, TNFRI dan TNFRII. Fas menginduksi apoptosis melalui dua jalur. Jalur pertama dengan mengikat ligan. Ikatan ligan mengaktifkan reseptor TNFRI dan Fas untuk menarik dan mengikat Protein *death effector* Fadd/Mort-1. Ikatan Fadd/Mort-1 menarik procaspase 8. Procaspase 8 diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu caspase 8 dan dilepaskan kembali ke dalam sitosol^{13,14}. Caspase 8 akan memecah dan mengaktifkan caspase 3. Jalur kedua lewat jalur alternatif sinyal transduksi. Reseptor Fas berikatan dengan protein adapter yang akan mengaktifkan *mitogen activating protein kinase* (MAP3) dan memicu kaskade fosforilasi yang meningkat pada aktivasi c-Jun N terminal kinase (JNK). JNK yang teraktivasi memfosforilasi substrat seperti c-Jun dan p53 dan menginduksi apoptosis lewat berbagai mekanisme, meliputi modifikasi dan pengaturan protein pada famili Bcl-2^{33,34}.

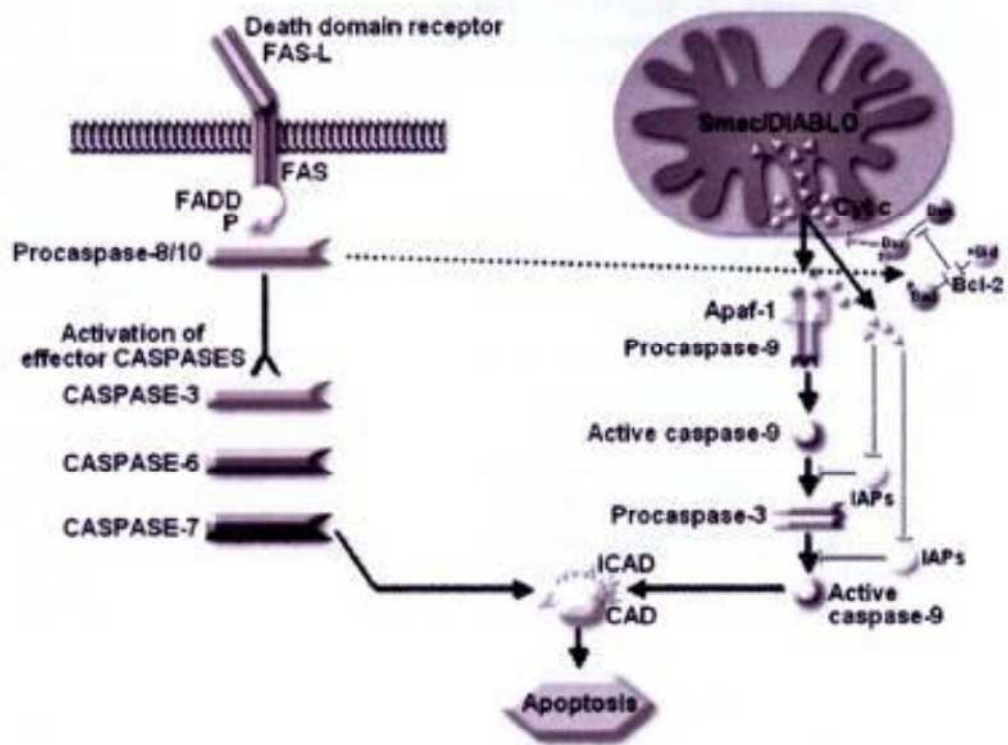
Pada jalur mitokondria, salah satu kejadian yang menyebabkan apoptosis adalah pelepasan sitokrom c dari mitokondria melalui porus yang dibentuk oleh *mitochondrial permeability transition pore* (PTP) dan protein pro apoptosis Bax^{13,14}. Jika PTP berasosiasi dengan Bax maka keduanya dapat membentuk suatu kanal spesifik untuk sitokrom c dan faktor-faktor yang menginduksi apoptosis. Asosiasi antara Bax dengan PTP dan aktivitas pembentukan porus dicegah oleh protein anti apoptosis Bcl-2. Sitokrom c

yang dilepaskan oleh mitokondria ke sitosol akan berinteraksi dengan Apaf-1 untuk membentuk apoptosom yang akan merekrut dan mengaktifasi procaspase-9. Caspase-9 yang aktif akan melakukan pemecahan terhadap caspase efektor yaitu caspase-3, -6, dan -7. Caspase efektor ini kemudian melakukan pemecahan terhadap banyak substrat di dalam sel yang penting, dan menimbulkan perubahan morfologis yang khas pada apoptosis^{31,32}.



Gambar 1 : Mekanisme molekuler terjadinya apoptosis

Mekanisme apoptosis yang dipacu oleh adanya kerusakan DNA atau stres sel, sinyal ini diteruskan protein Bax ke mitokondria sehingga menyebabkan lepasnya sitokrom c, dilanjutkan dengan aktifasi jalur caspase. Proses ini dihambat oleh Bcl-2 dan IAPs. (Pecorino, 2005)



Gambar 2. Mekanisme molekuler terjadinya apoptosis

Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik distimulasi oleh FAS Death Receptor, jalur intrinsik distimulasi oleh pelepasan cytochrome-c oleh mitokondria. (Pecorino, 2005)

Apoptosis dan gen yang mengontrolnya mempunyai efek yang besar pada fenotip keganasan. Mutasi onkogenik yang mengganggu apoptosis mempengaruhi inisiasi tumor, progresifitas tumor dan metastase.

Hampir semua obat anti kanker yang digunakan sekarang, dikembangkan dengan penyaringan yang dirancang untuk mengidentifikasi bahan yang secara selektif membunuh tumor. Hubungan antara apoptosis dengan terjadinya kanker memberikan ide penelitian tentang target dan mekanisme farmakologi obat-obat anti kanker^{31,32}. Suatu obat anti kanker yang poten untuk menginduksi dan mengaktifkan apoptosis dapat

menghindari banyaknya efek samping yang tidak diharapkan karena pelepasan material-material sampah akibat nekrosis sel, dan mengurangi kerusakan sel-sel normal yang disebabkan oleh kemoterapi. Proses apoptosis juga dapat digunakan untuk mengevaluasi toksisitas obat. Gangguan dan mutasi gen pada program apoptosis dapat mengurangi sensitivitas terapi dan menyebabkan resistensi obat.

2.5. Siklus Sel

Pada kanker terjadi perubahan pada pengaturan siklus sel. Selama perkembangan sel kanker, baik secara genetik maupun epigenetik, biasanya mempengaruhi ekspresi protein-protein pengatur siklus sel. Hal ini dapat menyebabkan *overekspresi cyclin* dan kehilangan ekspresi *CDK inhibitor* dan mengakibatkan deregulasi aktivitas CDK. Pada sel kanker juga terjadi ketidakmampuan kontrol *checkpoint*, mengakibatkan respon yang menyimpang terhadap adanya kerusakan seluler. Contohnya, kerusakan DNA pada fase G1 normalnya menyebabkan berhentinya siklus sel atau terjadi apoptosis tergantung pada tingkat kerusakannya, sehingga sel tidak bisa memasuki fase S karena dihentikan pada G1³⁶. Ketidakmampuan kontrol *checkpoint* menyebabkan inisiasi fase S atau mitosis tetap berlangsung meskipun ada kerusakan seluler dan ketidakstabilan genetik yang selanjutnya menimbulkan *clone malignant*^{35,36}

Aktivitas dari kompleks cyclin-CDK yang mengontrol *checkpoint tersebut* diatur dengan cara fosforilasi dan defosforilasi. Satu substrat protein utama dari CDK adalah Rb. Rb saat kondisi hipofosforilasi berikatan dan menginaktifkan faktor transkripsi E2F. Fosforilasi melepaskan E2F dari

kompleks Rb dan E2F. E2F merupakan faktor transkripsi cyclin E, cyclin A dan protein-protein lain yang terlibat dalam siklus sel. Cyclin E membentuk kompleks dengan CDK2 dan meningkatkan fosforilasi Rb. E2F yang dihasilkan akan menginduksi transkripsi gen seperti *DNA polymerase* dan *thymidin kinase*.^{35,36}

Protein lain yang berperan dalam kontrol *checkpoint* ini antara lain p53, CDKI p21. Pada sel yang normal, ekspresi p53 rendah. Ketika terjadi kerusakan DNA maka p53 akan teraktivasi dan mengaktifkan p21 yaitu suatu *Cdk Inhibitor*^{35,36}. p21 ini akan mengikat dan menginaktifkan kompleks CDK4 yang akan menyebabkan fosforilasi Rb terhambat dan pelepasan faktor transkripsi E2F terhenti sehingga siklus sel terhenti pada tahap G1-S. Saat siklus sel terhenti, DNA mempunyai kesempatan untuk memperbaiki diri sebelum memasuki tahap pembelahan selanjutnya. Jika kerusakan DNA berat dan tidak bisa direparasi maka sel akan memasuki jalur apoptosis.

Tidak berfungsinya kontrol *checkpoint* mengakibatkan gagalnya respon penghentian siklus sel pada sel kanker dapat menjadi target potensial terapi antikanker⁶. Sel dengan kontrol *checkpoint* yang rusak lebih sensitif terhadap perubahan *genotoksik* atau kerusakan mikrotubular. Pengembangan obat antikanker yang didasarkan pada regulasi siklus sel selanjutnya diarahkan pada penghambatan terjadinya proses pembelahan sel, sehingga senyawa atau protein yang diberikan pada penderita dapat mencegah sintesis DNA dan mitosis sehingga menghentikan proliferasi sel kanker^{35,36}.

2.6. Peran p21 dalam penghambatan siklus sel

Ekspresi beberapa mediator apoptosis secara transkripsi diregulasi secara direk oleh p53 . Target-target meliputi gen-gen yang memberikan kode untuk protein yang terlibat dalam dua apoptotic pathway yang masing-masing berespon terhadap sinyal eksternal dan internal. Secara umum, protein-protein yang mengkode gen-gen yang mempromosikan apoptosis, protein pro-apoptotik, diinduksi sementara protein mengencode gen yang antagonis apoptosis, protein anti-apoptotik, ditekan. Protein pro-apoptotik mitokondria NOXA, PUMA, dan p53AIP1, yang menyebabkan pelepasan *cytochrome-c* dan mengaktivasi caspase. Protein p53 mengganggu stabilitas sel yang diregulasi oleh famili protein Bcl-2 terhadap apoptosis dengan menginduksi ekspresi gen protein pro-apoptotik Bax dan menekan ekspresi protein anti-apoptotik Bcl-2. Fas receptor (FASR) adalah suatu reseptor transmembran yang menerima stimuli ekstraselular untuk menstimulasi apoptosis. Ekspresi gen Fas receptor diinduksi oleh p53. Apoptosis juga dipicu ketika *survival signaling* diblok oleh induksi p53 terhadap IGF-BP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3). IGF-BP3 memblok sinyal IG-1 ke reseptornya. Aktivasi pathway yang berbeda ini dalam rangkaian dibutuhkan untuk memenuhi respon apoptotik yang lengkap.

Satu dari fungsi utama p53 adalah menghentikan siklus sel sebagai respon terhadap kerusakan DNA sehingga ada kesempatan untuk memperbaiki kerusakan sebelum babak replikasi selanjutnya, oleh karena itu DNA yang rusak akan dicegah mengalami replikasi dan menurunkan ke sel anakan dan hal tersebut akan menjaga genome. Mekanisme molekular

yang bertanggung jawab untuk respon selular ini meliputi induksi transkripsi gen p21. Produknya, protein p21, yang berperan sebagai pengikat beberapa kompleks *cyclin-cdk* dan menyebabkan berhentinya transisi G1 ke S (dan G2 ke M) pada siklus sel.

Selain hal di atas, p21 juga mengikat PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), suatu protein yang memiliki peran dalam sintesis DNA dan perbaikan DNA. Interaksi p21 dengan PCNA akan menghambat peran PCNA dalam replikasi DNA. Oleh karena itu, p21 adalah bagian penting dalam mekanisme molekular yang memfasilitasi kemampuan p53 untuk menghentikan siklus sel dan pada waktu yang sama memberi kesempatan untuk perbaikan DNA dan apoptosis.⁶⁻¹²

Ki 67 digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel atau pertumbuhan neoplasma. Penamaan diambil dari nama kota Kiel penomoran diambil dari original clone pada 96- wellplate. Ki 67 protein dikenal sebagai monoklonal antibody Ki-67 atau MK 167. Pada interfase Ki 67 dapat dideteksi melalui nukleus, dimana pada saat terjadi mitosis banyak protein ditampung pada permukaan sel. Ki 67 protein tampak selama fase aktif siklus sel (G1, S, G2 dan mitosis), tetapi tidak tampak pada fase istirahat (G0). Ki 67 merupakan petanda yang baik untuk pertumbuhan tumor⁽¹²⁾.