

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. KANKER PAYUDARA**

##### **2.1.1. ETIOLOGY DAN PATOGENESIS**

Karsinoma adalah keganasan yang timbul dari sel-sel epitel. Dikatakan ganas karena menginvasi jaringan dan organ sekitar serta menyebar ke organ-organ jauh, misalnya ke otak. Adenocarcinoma adalah karsinoma yang timbul dari jaringan kelenjar.<sup>41</sup> Kanker merupakan penyakit di mana proliferasi sel tidak terkontrol. Proliferasi sel diatur oleh *cell cycle checkpoint*. Hal ini dipengaruhi oleh 2 macam gen yaitu gen protoonkogen dan gen tumor suppressor gen.<sup>42</sup>

Kanker payudara timbul pada unit duktus lobularis terminal. Tipe yang paling umum pada keganasan payudara yaitu karsinoma duktus invasif dan merupakan 85% dari kanker payudara. Karsinoma yang terbatas pada duktus lobularis terminal dan lobulus yang terkait dan duktus dikenal sebagai karsinoma in situ. Lesi pada tipe ini adalah local dan oleh karena itu dibatasi oleh membran basal. Lesi proliferasi abnormal yang tidak merupakan karsinoma insitu dinamakan hiperplasia atipik. Secara umum diterima bahwa hiperplasia tersebut berlanjut pada karsinoma in situ, yang menjadi karsinoma invasif.<sup>43</sup>

Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara :

- a. Faktor genetik
- b. Hormon
- c. Faktor lingkungan

### **2.1.2. KLASIFIKASI KANKER PAYUDARA**

Berdasarkan gambaran gejala klinis, Internasional Union Against Cancer (UICC) membuat klasifikasi TNM sebagai berikut .<sup>12,44</sup>

T = Tumor primer

Tx = tumor primer tak dapat diperiksa

T0 = tidak terdapat tumor primer

Tis = karsinoma in situ

Tis (DCIS) ductal carsinoma in situ

Tis (LCIS) lobular carsinoma in situ

Tis (paget) paget disease

T1 = ukuran tumor  $\leq 2$  cm

T1a = ukuran tumor lebih dari 0,1 cm dan tidak lebih dari 0,5 cm

T1b = ukuran tumor lebih dari 0,5 cm dan tidak lebih dari 1 cm

T1c = ukuran tumor lebih 1 cm dan tidak lebih dari 2 cm

T2 = ukuran tumor lebih dari 2 cm dan tidak lebih dari 5 cm

T3 = ukuran tumor lebih dari 5 cm

T4 = semua ukuran tumor dengan ekstensi ke dinding dada atau kulit

T4a = ekstensi ke dinding dada

T4b = edema (termasuk peau d' orange), atau ulserasi kulit payudara, atau satelit nodul pada payudara ipsilateral

T4c = T4a dan T4b

T4d = inflammatory carcinoma

N = limfonodi regional

Nx = limfonodi regional tak dapat diperiksa

N0 = tak ada metastase di limfonodi regional

N1 = metastase di limfonodi aksila ipsilateral mobile

N2 = metastase di limfonodi aksila ipsilateral fixed

N2a = metastase di limfonodi aksila ipsilateral fixed antar limfonodi atau fixed ke struktur jaringan sekitarnya

N2b = metastase di limfonodi mamaria interna

N3a = metastase di limfonodi infraclavícula ipsilateral

N3b = metastase di limfonodi mamaria interna dan aksila ipsilateral

N3c = metastase di limfonodi supraclavícula

M = metastase jauh

Mx = metastase jauh tak dapat diperiksa

M0 = tak ada metastase jauh

M1 = metastase jauh

### Staging Kanker Payudara menurut UICC. <sup>12,44</sup>

Stadium 0	= Tis	N0	M0
Stadium I	= T1	N0	M0
Stadium IIA	= T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	= T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium III A	= T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium III B	= T4	N0,N1,N2	M0
Stadium III C	= Setiap T	N3	M0
Stadium IV	= Setiap T	Setiap N	M1

### 2.1.3. MODALITAS TERAPI KANKER PAYUDARA

Pembagian kanker payudara ditinjau dari modalitas terapi, dibagi menjadi beberapa kategori, yaitu : <sup>12</sup>

1. Stadium 0 atau Lesi in situ non metastase, yaitu ductal carcinoma in situ (DCIS) dan lobular carcinoma in situ (LCIS).
2. Stadium dini invasif ( stadium 1 dan beberapa dari stadium II)
3. Stadium intermediate operabel (stadium II dan IIIA)

4. Stadium in operabel atau stadium lanjut lokal (stadium IIIA – IIIC)
5. Stadium lanjut (stadium IV)

Tujuan pengobatan kanker payudara adalah :<sup>13,14</sup>

1. Untuk menyembuhkan, yaitu dengan cara menghilangkan tumor. Upaya penyembuhan ini dapat dinilai dengan lamanya waktu bebas tumor (long disease free) dan lamanya bertahan hidup (long overall survival).
2. Untuk meningkatkan, mengembalikan kualitas hidup, yang dapat dinilai secara fungsional, kosmetik dan penampilan sosial (sebagai terapi paliatif).
3. Untuk mencegah terjadinya kanker payudara (preventif)

Modalitas terapi yang dapat digunakan adalah :<sup>12-14</sup>

1. Pembedahan, meliputi Breast Conservation Surgery (BCS), simple mastektomi (SM), radikal mastektomi (RM), maupun modified radikal mastektomi (MRM). Pembedahan merupakan suatu upaya terapi yang bersifat lokal.
2. Radioterapi, merupakan upaya terapi yang bersifat lokoregional.
3. Kemoterapi, bersifat sistemik
4. Hormon terapi, bersifat sistemik.
5. Molekular targeting terapi (biologi terapi).

Penggunaan modalitas terapi ini tergantung pada tujuan pengobatan dan stadium kanker payudara.

## **2.2. KEMOTERAPI**

Kemoterapi berarti menggunakan obatan – obatan untuk membunuh sel kanker.<sup>31,45</sup> Kemoterapi dapat diberikan secara intravena ataupun peroral. Bagi penderita kanker, kemoterapi dapat diberikan dengan tujuan:<sup>46,47</sup>

1. Sebagai terapi induksi, yaitu kemoterapi merupakan satu – satunya pilihan terapi untuk keganasan yang telah menyebar atau keganasan dimana tidak ada pilihan terapi lainnya.
2. Sebelum pembedahan, untuk mengecilkan ukuran tumor (neoadjuvan terapi)
3. Setelah pembedahan, untuk mengurangi penyebaran atau kekambuhan (adjuvan terapi).
4. Sebagai pengobatan setempat, yaitu obat kemoterapi disuntikkan langsung ke dalam tumor, misal pada kanker hati.

Pada penderita kanker payudara, kemoterapi diberikan sebagai neoadjuvan ataupun adjuvan terapi.<sup>12,13,14, 46,48</sup>

### **2.2.1. MEKANISME KERJA KEMOTERAPI**

Obat – obat kemoterapi terutama bekerja pada DNA yang merupakan komponen utama gen yang mengatur pertumbuhan dan differensiasi sel. Oleh karena itu, maka obat kemoterapi tidak hanya bekerja pada sel kanker tapi juga pada sel sehat.<sup>46-48</sup> Mekanisme kerjanya adalah sebagai berikut :<sup>46,47</sup>

1. Menghambat atau mengganggu sintesa DNA dan atau RNA
2. Merusak replikasi DNA

3. Mengganggu transkripsi DNA oleh RNA

4. Mengganggu kerja gen

Obat – obat kemoterapi ini ada yang bekerja pada fase spesifik (fase M, S, G1, G2) dan ada juga yang bekerja pada fase nonspesifik, yaitu pada semua fase dalam siklus sel.<sup>46,47</sup>

Obat – obat kemoterapi berdasarkan cara kerja obat pada fase siklus pertumbuhan sel dibedakan menjadi :<sup>47,48</sup>

1. Alkylating Agent (Busulfan, Carboplatin, Carmustine, Chlorambusil, Cisplatin, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Procarbazine)
2. Golongan antimetabolit, (Fluorouracil, methotrexate, asparaginase, azacitidine, cladribine, cytarabine, fludarabine, hydroxyurea, mercaptopurine, pentostatin, raltitrexed, thioguanine).
3. Obat kemoterapi yang membunuh sel kanker dengan cara menghalangi mitosis, secara inhibisi fungsi chromatin. Ada 2 golongan, yang pertama adalah golongan topoisomerase inhibitors (Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Etoposide, Gemcitabine, Idarubicin, Irinotecan, Mitoxantrone, Plicamycin, Teniposide, Topotecan). Golongan kedua adalah penghambat microtubule (Doxetacel, Paclitaxel, Vinblastine, Vincristin).
4. Sebagai antibiotika yang mengikat DNA secara ikatan kompleks, yang dikenal sebagai golongan Antracycline (Bleomycin, Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Mytocin C).
5. Sebagai hormon (estrogen, progestin, anti estrogen, androgen).

6. Golongan yang belum jelas kerjanya (Nitrosurea, Cisplatin).

Akibat kerja obat – obat kemoterapi ini akan menimbulkan radikal bebas.

### **2.2.2. PEMILIHAN OBAT KEMOTERAPI**

Dalam memberikan obat kemoterapi, harus memperhatikan :<sup>16,47</sup>

1. tepat indikasi
2. tepat jenis obat
3. tepat dosis
4. tepat waktu
5. tepat cara pemberian
6. waspada efek samping obat

Pemberian kemoterapi membutuhkan waktu yang cukup lama. Biasanya dinamakan dengan istilah siklus. Satu siklus terdiri dari masa pemberian obat, yang biasanya bervariasi antara 1 – 5 hari, dan setelah itu dilanjutkan dengan masa istirahat selama 3 minggu. Pemberian kemoterapi dapat dilakukan sebanyak 4 – 8 siklus, sesuai dengan tujuan pemberian kemoterapi tersebut.<sup>16</sup> Lamanya pemberian kemoterapi ditentukan oleh :<sup>16,47</sup>

1. tipe keganasan
2. obat – obatan yang digunakan
3. respon terhadap obat kemoterapi

Kemoterapi yang diberikan biasanya merupakan suatu kombinasi. Salah satu tujuan utama pemberian kemoterapi kombinasi adalah untuk mencegah

timbulnya sel kanker yang resisten.<sup>46-48</sup> Resistensi terhadap obat – obat kemoterapi dapat terjadi melalui berbagai cara, misalnya :<sup>46,47</sup>

1. terjadinya impermeabilitas dinding sel terhadap kemoterapi
2. perubahan spesifisitas enzim di dalam sel sebagai sasaran kemoterapi
3. perubahan terhadap efek hambatan biokimiawi sitostatika

Sampai saat ini tidak ada kemoterapi yang dapat menghancurkan sel kanker secara tuntas atau 100%. Setiap kali obat kemoterapi diberikan, paling banyak 99,9% sel kanker yang mati. Dengan menggunakan dua jenis kemoterapi, diharapkan semakin banyak sel kanker yang dapat mati, sehingga secara teoritis dikatakan bahwa kombinasi sitostatika dapat menekan populasi sel kanker hingga nol. Pemberian kemoterapi secara kombinasi menyebabkan efek samping yang bertambah pada jaringan sehat. Beberapa prinsip yang harus diterapkan dalam pemberian kemoterapi secara kombinasi adalah:<sup>46,47</sup>

1. Hanya menggunakan obat kemoterapi yang berdaya guna terhadap sel kanker yang diobati.
2. Obat – obatan yang dipakai harus mempunyai daya kerja yang berbeda, agar dapat dicegah timbulnya resistensi.
3. Obat yang dipilih harus memiliki efek samping yang berbeda sehingga dapat diberikan dengan dosis penuh atau mendekati penuh.
4. Sedapat mungkin dilakukan secara intermiten, diselingi masa bebas pengobatan.

Kombinasi obat – obat kemoterapi yang biasa digunakan untuk keganasan payudara adalah :<sup>16,48</sup>

1. CMF (cyclophosphamide, methotrexate dan 5 – FU)
2. FEC (Epirubicin, cyclophosphamide dan 5 – FU)
3. E-CMF (Epirubicin, yang digabung dengan CMF)
4. AC (doxorubicin (adriamycin), Cyclophosphamide)
5. MMM (methotrexate, mitozantrone, mitomycin)
6. MM (methotrexate dan mitozantrone)

Sesuai dengan protokol Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi (PERABOI) menyebutkan bahwa kemoterapi direkomendasikan sebagai modalitas terapi kanker payudara adalah untuk stadium 3. Adapun untuk stadium 1 dan 2, modalitas utamanya adalah operasi. Pada stadium 4, modalitas terapi utamanya adalah terapi hormonal dan ajuvan kemoterapi.<sup>12</sup> *First line* kemoterapi untuk kanker payudara saat ini adalah *adriamycin based chemotherapy*, terutama bila ekspresi *c erb-2* nya positif.<sup>49</sup> Untuk pengobatan kemoterapi pada stadium 4 dapat dilakukan dengan modalitas terapi *single agent* yaitu dengan Doxorubicin.<sup>50</sup> Respon kemoterapi dinilai dengan kriteria WHO yaitu dengan kategori *Complete Respons (CR)*, *Partial Respons (PR)*, *No Respons (NR)*, dan *Progressive Disease (PD)*.<sup>16</sup> Respon terapi juga dipengaruhi oleh derajat histopatologi selnya.<sup>15</sup> Pada kasus-kasus yang diperlukan untuk pengecilan massa tumor dilakukan pemberian neoadjuvant kemoterapi yang dapat berupa kombinasi antara Adriamycin 80 mg/m<sup>2</sup> dan Cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup>.

### **2.2.3. RESPON KEMOTERAPI**

WHO membedakan respon kemoterapi menjadi :<sup>16</sup>

1. Complete Remission (CR) : tumor menghilang, yang ditentukan melalui dua penilaian dengan selang waktu yang tidak kurang dari 4 minggu.
2. Partial Remission (PR): ukuran tumor berkurang  $\geq 50\%$ , yang ditentukan melalui 2 penilaian dengan selang waktu yang tidak kurang dari 4 minggu, dan tidak ada pertumbuhan tumor baru atau peningkatan lesi yang telah ada.

Pengukuran dapat berupa :

#### 2.1. bidimensional

2.1.1. lesi tunggal : ukuran tumor berkurang 50%

2.1.2. lesi multipel : jumlah tumor berkurang 50%

2.2. unidimensional : ukuran tumor berkurang 50% secara linier .

3. No Change (NC) : ukuran tumor berkurang  $< 50\%$  atau ada pertumbuhan sebanyak 25 %.
4. Progression (P) : ukuran tumor bertambah besar  $> 25\%$  atau ada pertumbuhan tumor baru.

### **2.2.4. EFEK SAMPING KEMOTERAPI**

Selain membunuh sel kanker, kemoterapi juga merusak sel dari berbagai jaringan sehat.<sup>6,26,44-48</sup> Jaringan yang paling banyak mengalami kerusakan adalah organ – organ yang mempunyai daya proliferasi tinggi, seperti traktus gastrointestinal, sumsum tulang, dan folikel rambut.<sup>6,16,26 ,46-48</sup>

Pada traktus gastrointestinal, gejala yang paling utama adalah mual, muntah, diare dan mukositis.<sup>6,16,26 ,46-48</sup> Mual dan muntah biasanya timbul selang beberapa jam setelah pemberian kemoterapi dan berlangsung tidak lebih dari 24 jam.<sup>48</sup> Efek muntah yang terjadi seringkali sulit diatasi dengan obat antimuntah konvensional.<sup>51</sup>

Gejala klinis supresi sumsum tulang terutama disebabkan oleh terjadinya penurunan jumlah sel darah putih, sel trombosit dan sel darah merah. .<sup>6,16,26 ,46-48</sup> Supresi sumsum tulang akibat pemberian sitostatika dapat terjadi segera atau kemudian. Pada supresi sumsum tulang yang terjadi kemudian, penurunan kadar lekosit mencapai nilai terendah pada hari ke-8 sampai dengan hari ke -14. setelah itu diperlukan waktu kurang lebih tujuh hari untuk menaikkan kadar lekosit kembali. Penurunan kadar lekosit ini dapat terjadi dua kali, yaitu pada minggu kedua dan pada minggu keempat dan kelima. Pada minggu keenam, kadar lekosit akan mendekati nilai normal.<sup>52</sup> Rambut rontok dapat bervariasi dari kerontokan ringan sampai pada kebotakan. .<sup>6,16,26 ,46-48,52</sup>

Tabel 1. Efek samping kemoterapi<sup>16,26</sup>

<b>Organ</b>	<b>Efek samping</b>
Sumsum tulang	Leukopeni, trombositopeni, anemia
Gastrointestinal	Stomatitis, gastritis, diare, ulkus lambung, ileus
Jantung	Kardiomiopati, hipertensi
Paru	Fibrosis
Hati	Fibrosis
Ginjal	Nekrosis tubuli
Kulit	Alopesia, hiperpigmentasi
Syaraf	Parestesi, neuropati, tuli, letargi
Pankreas	Pankreatitis
Uterus	Perdarahan
Kandung kencing	Sistitis hemoragis

Efek samping lainnya yang jarang terjadi tapi tak kalah pentingnya adalah kerusakan otot jantung, sterilitas, fibrosis paru, kerusakan ginjal, kerusakan hati, sklerosis kulit, reaksi anafilaksis, gangguan syaraf, gangguan hormonal, perubahan genetik yang dapat mengakibatkan kanker baru.<sup>16,46-48,52</sup>

Kardiomiopati akibat obat doxorubicin dan daunorubicin umumnya sulit diatasi, sebagian besar penderita menderita akibat pumpfailure. Fibrosis paru umumnya bersifat irreversible.<sup>46,52</sup>

Di bagian Bedah Onkologi RSDK, regimen kemoterapi yang digunakan adalah CAF / CEF (Cyclophosphamide, Adryamicin / Epirubicin, Flurouracil) sebagai terapi lini pertama. Oleh karena itu, kemungkinan efek samping yang dapat terjadi tampak pada tabel 2.

Tabel 2 : Efek samping CAF / CEF

Obat	Efek segera	Efek lambat
Cyclophosphamide	Mual muntah	Myelosupresi, chemical cystitis, alopesia, karsinogen
Epirubicin	Mual muntah	Myelosupresi, alopesia, kardiomiopati
Fluorouracil	Mual, diare	Myelosupresi, angina

### **Adriamycin / Anthracyclin**

Adriamycin/anthracyclin adalah antibiotic golongan anthracyclin yang sitotoksik, yang masih direkomendasikan sebagai *first line chemotherapy* pada kanker payudara. Anthracyclin diisolasi dari kultur *Streptomyces peuceetius* varian *caesius*. Adriamycin mengandung rantai inti *naphthacenequinon* yang berikatan dengan gula amino (*daunosamine*) melalui ikatan glikosidik pada cincin

atom ke 7.<sup>17,19,20,53,55</sup> Adriamycin yang tersedia di pasaran berupa adriamycin hidroklorida dengan nama kimianya adalah : *5,12-Naphthacenedione, 10[(3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-hydrochloride (8S-cis)*.

Adriamycin berikatan secara interkalasi spesifik dengan asam nukleat DNA dobel heliks pada bagian planar inti anthracyclin. Cincin anthracyclin bersifat lipofil, tetapi ikatan pada cincin terakhir mengandung gugus hidroksil yang terikat pada senyawa gula, sehingga membentuk tempat yang hidrofili. Molekul bersifat amfoter yang memiliki grup cincin fenol yang bersifat sedikit asam. Struktur fungsi dasarnya adalah pada gula amino yang berikatan dengan membrane sel sebagai plasma protein.<sup>17,19,20,53,55</sup>

Efek sitotoksik adriamycin pada sel-sel maligna, dan efek toksik pada berbagai organ berhubungan dengan interkalasi pada nukleotida dan aktivitas ikatan pada membran lipid sel. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa Adriamycin memiliki afinitas ikatan yang kuat terhadap proteasom dan menghambat aktivitas proteasom. Adriamycin juga diketahui dapat mengaktifkan enzim *caspase* yang dapat menginduksi apoptosis suatu sel maligna. Mekanisme molekuler yang pasti belum diketahui.<sup>17,19,20,27</sup>

Pada percobaan dengan sel Leukimia L1210 diketahui *Inhibitory Concentration (IC50)*-nya adalah 25µM. Pada penelitian, secara farmakokinetik yang dilakukan terhadap berbagai tumor, baik dengan pemberian tunggal maupun *multi-agent therapy* menunjukkan bahwa Adriamycin mempunyai disposisi obat yang multiphasik. Pada awalnya *half-life* distribusinya mendekati 5 menit,

dimungkinkan karena *uptake* jaringan yang cepat, sampai pada *half-life* terakhir 20-48 jam. *Steady-state distribution volume* lebih dari 20-30 L/Kg. Klirens plasma 8 – 20 mL/min/Kg, dimetabolisme di hepar dan diekskresi melalui cairan empedu. Lebih kurang 40% dari dosis yang diberikan muncul pada cairan empedu pada hari ke-5 pemberian, dan hanya 5 – 12 % yang diekskresi dan muncul pada urine dalam waktu yang sama. Ikatan metabolit aktif terhadap plasma sekitar 74 – 76 %. Rentang dosis 30 – 70 mg/m<sup>2</sup>. Clearance sistemik secara bermakna akan turun pada orang gemuk dengan berat badan lebih dari 130% berat badan ideal, dan pada orang-orang dengan gangguan fungsi hepar. Adriamycin diekskresi pada air susu ibu dengan konsentrasi puncak 24 jam setelah pemberian sebesar 4,4 kali konsentrasi plasma.<sup>17,53</sup>

### **Cyclophosphamide**

Cyclophosphamide disebut juga cytophosphane, yang merupakan *alkylating agent* dari golongan *nitrogen mustard* dalam kelompok *oxazophorin*. *Alkylating antineoplastic agent* adalah *alkylating agent* yang berikatan dengan kelompok alkyl pada DNA. Zat ini menghentikan pertumbuhan tumor dengan cara *cross-link* baik *interstrand* maupun *intrastrand* di basa *guanin* posisi N-7 pada DNA *double helix*, ikatan ini menyebabkan DNA akan terpisah/pecah, sehingga sel gagal membelah dan mati. Pemberian dalam dosis tinggi dapat mengakibatkan pansitopenia dan cystitis.<sup>54</sup>

Efek utama dari cyclophosphamide adalah pada metabolitnya yaitu *phosphoramidate mustard* produk toksik lain yaitu *acrolein*. Metabolit ini terjadi

hanya pada sel-sel yang mengandung sedikit *Aldehyde dehidrogenase (ALDH)*.<sup>19,20,55,56</sup>

### **2.3. APOPTOSIS**

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *progammed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatik intraseluler. Enzim, 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.<sup>57,58</sup>

Proses apoptosis perlu dibedakan dengan proses nekrosis. Apoptosis adalah kematian sel per sel, sedangkan nekrosis melibatkan sekelompok sel. Membran sel yang mengalami apoptosis akan mengalami penonjolan – penonjolan keluar tanpa disertai hilangnya integritas membran. Sedangkan sel yang mengalami nekrosis mengalami kehilangan integritas membran. Sel yang mengalami apoptosis terlihat menciut, dan akan membentuk badan apoptosis. Sedangkan sel yang mengalami nekrosis akan terlihat membengkak untuk mengalami lisis. Sel yang mengalami apoptosis lisosomnya utuh, sedangkan sel yang mengalami nekrosis terjadi kebocoran lisosom.<sup>57,58</sup>

Proses apoptosis dikontrol oleh sinyal-sinyal sel yang berbeda-beda, baik yang berasal dari luar sel (jalur ekstrinsik) atau intraseluler (jalur intrinsik). Sebelum enzim-enzim melakukan proses-proses kematian sel, sinyal apoptosis harus diterima terlebih dahulu oleh *death pathway* melalui protein-

protein regulator. Protein regulator ini dapat mengatur apakah sel tersebut harus mati atau belum perlu mati. Target utama sinyal apoptosis adalah mitokondria fungsional atau langsung ke jalur apoptosis melalui protein *adapter*. Proses apoptosis ini membutuhkan energi dan berfungsinya organel sel.<sup>57,58</sup>

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. Mitokondria merupakan organel sel yang penting. Protein pro apoptosis yang targetnya mitokondria akan membuat kerusakan dengan cara yang berbeda-beda. Kerusakan dapat berupa bengkaknya membran mitokondria sehingga timbul pori-pori atau meningkatnya permeabilitas membran mitokondria sehingga akan terjadi kebocoran protein-protein yang memicu apoptosis.

Protein mitokondria pemicu apoptosis di antaranya adalah SMACs (second mitochondria-derived activator of caspases) yang akan dilepaskan ke sitosol bila terjadi kenaikan permeabilitas membran mitokondria. SMACs ini akan berikatan dengan *inhibitor of apoptosis protein (IAP)* sehingga tidak aktif. IAP juga akan menekan aktivitas *cystein protease (caspase)*.

Cytochrome juga akan dilepaskan dari membran mitokondria. Cytochrome setelah dilepaskan akan berikatan dengan *Apaf-1* dan ATP dan pro caspase-9 membentuk kompleks protein dengan nama apoptosome. Hal ini akan mengaktifkan pro-caspase 9.

MAC sendiri dapat diatur oleh bermacam-macam protein yang dikode oleh gen anti-apoptosis dalam famili Bcl-2 yang homolog dengan gen ced-9.

Protein Bcl-2 dapat menghentikan apoptosis meskipun cytochrom-c sudah dilepaskan oleh mitokondria.<sup>57,58</sup>

Kerusakan DNA dipicu oleh enzim caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa protease cystein. Saat ini sudah dikenal ± 12 jenis caspase. Protein target dari caspase ini adalah protein *DNA repair system* [seperti (ADP-ribose)-polymerase], protein struktural/sitoskeletal (seperti lamin, actin, cytokeratin, dll) , dan onkoprotein (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, caspase juga akan mengaktifkan Dnase yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis. Sehingga yang akan terjadi adalah melisutnya organel dan inti sel.<sup>58</sup>

Caspase (terutama caspase 8 dan 10) dapat diaktifkan oleh granzyme maupun suatu katalisator protease yaitu FLICE (FADD-Like IL-1 Converting Enzyme) yang berikatan oleh FADD (Fas-Associated Death Domain), pada reseptor CD95/Fas setelah kontak dengan Fas ligand. Pengaktifan caspase melalui reseptor CD95/Fas terjadi bila kontak dengan Fas ligand. Fas ligand ini bisa berasal dari ekspresi protein antigen dari CTL, sitokin TNF, ataupun metabolit ligand pada Fas reseptor seperti polyphenol yang terkandung dalam *tanaman obat*.<sup>57,58</sup>

Apoptosis dapat diinduksi oleh CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand-induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin. Aktifasi *secretory induce* caspase dilakukan oleh CTL dan sel-NK oleh granula sitotoksiknya yang berisi protein *pore-forming* perforin (cytolysin) dan enzim famili dari serine protease yang bernama

granzyme sebagai senjata dari CTL/sel-NK. Granzyme ini terdiri dari granzyme B, granzyme A.<sup>59</sup>

Secara mikroskopik apoptosis dapat diketahui dengan pengecatan HE, dengan melihat *apoptotic body* yang ada. *Apoptotic body* secara mikroskopik dengan pengecatan HE akan tampak sebagai 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 intak dengan gambaran halo yang jelas.

25,38

Sel apoptosis dapat dilihat secara mikroskopis dengan prosesing jaringan rutin, pengecatan H&E maupun pengecatan immunohistokimia *TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)* assay. Prinsip metode ini adalah perpaduan antara reaksi molekular dengan immunohistokimia, dimana reaksi molekular ditandai adanya ligasi antar fragmentasi DNA dengan degoxigenin dengan bantuan enzim TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) dan reaksi imunohisto-kimia yang ditandai adanya reaksi imunologi yaitu reaksi antara antigen dan antibodi dan reaksi kimiawi yaitu adanya reaksi enzim dengan substrat. Pemeriksaan apoptosis yang lebih akurat dapat dilakukan dengan *TUNEL Dead End Colorimetric (TDEC)*.<sup>59</sup> Pemeriksaan ini merupakan modifikasi pemeriksaan *TUNEL* yang dirancang untuk mendeteksi sel apoptosis secara sederhana, akurat dan cepat pada tingkat sel tunggal. *TDEC* mengukur fragmentasi DNA nuklir yang merupakan indikator biokimia penting dari apoptosis dengan cara memberikan label akhir fragmentasi DNA dari sel

apoptosis. Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk memeriksa sel apoptosis pada potongan jaringan atau sel yang dibiakkan.<sup>60</sup>

#### **2.4. SUMSUM TULANG.**

Sumsum tulang merupakan jaringan yang terdapat pada ruang berongga di dalam tulang. Pada orang dewasa sumsum tulang memproduksi sel-sel darah baru. Beratnya sekitar 4% dari total seluruh berat tubuh.

Terdapat dua macam sumsum tulang, yaitu sumsum tulang merah (tersusun dari jaringan myeloid) dan kuning (tersusun dari sel-sel lemak). Pada saat lahir semua sumsum tulang merupakan sumsum tulang merah dan dengan bertambahnya umur sebagian berubah menjadi sumsum tulang kuning.<sup>23</sup>

Leukosit merupakan sel sistem imun tubuh yang diproduksi oleh sel multipotent di sumsum tulang yang dikenal dengan nama sel stem hematopoietik. Jumlah normal dalam darah adalah 4.000 – 11.000 leukosit per mm<sup>3</sup> darah manusia. Dari jumlah ini, *granulosit (leukosit polimorfonuklear, PNM)* yang terbanyak. *Granulosit* muda mempunyai inti berbentuk sepatu kuda yang menjadi bermultikokus sewaktu sel ini tumbuh lebih tua. Sebagian besar dari granulosit ini terdiri dari *granula neutrofilik (neutrofil)*, dan sisanya adalah granula yang terwarnai dengan zat warna asam (*eosinofil*) dan granula yang membunyai basofilik (*basofil*). Dua jenis sel lain yang dalam kondisi normal ditemukan dalam darah tepi merupakan *limfosit*, yaitu sel dengan inti bulat besar serta sedikit sitoplasma, dan *monosit*, sel dengan banyak sitoplasma agranular dan inti berbentuk ginjal. Secara bersama – sama, *granulosit, limfosit* dan *monosit*

memberikan pertahanan tubuh yang kuat terhadap tumor serta infeksi virus, bakteri dan parasit.<sup>23,24</sup>

Leukopenia adalah kondisi dimana jumlah leukosit dalam darah kurang dari 4.000 per mm<sup>3</sup>. Karena *granula neutrofilik (neutrofil)* merupakan jumlah terbanyak dari keseluruhan leukosit, maka kondisi berkurangnya neutrofil dalam darah (neutropenia) pada umumnya diidentikan dengan leucopenia. Neutropenia terjadi karena (1) neutropoiesis hipoplastik, (2) neutropoiesis infeksi (terjadi dari apoptosis berlebihan pada prekursor akhir), (3) peningkatan kecepatan penggantian dan penggunaan neutrofil sirkulasi, (4) pergeseran sel dari sirkulasi pada pool marginal tubuh, atau (5) kombinasi mekanisme tersebut. Beberapa kelainan produksi disebabkan oleh abnormalitas intrinsik sel progenitor hemopoiesis. Kelainan lainnya pada produksi sel disebabkan oleh faktor ekstrinsik, termasuk perubahan lingkungan sumsum, seperti infiltrasi tumor, fibrosis, atau iradiasi. Obat kemoterapi myelotoksik umumnya menyebabkan neutropenia karena aktivitas proliferasi aktif prekursor neutrofil pada sumsum tulang dan waktu paruh yang pendek dari neutrofil darah.<sup>62-64</sup>

Trombosit merupakan jaringan kecil bergranulasi yang berdiameter 2 – 4 µm, dan dalam kondisi normal konsentrasi trombosit sekitar 150.000 - 300.000 per mm<sup>3</sup> darah yang bersirkulasi. dan mempunyai waktu paruh sekitar 4 hari. Trombosit dibentuk oleh megakariosit (sel datia dalam sumsum tulang) dengan mengambil sedikit sitoplasma dan mengeluarkannya ke dalam sirkulasi. Produksi trombosit diregulasi oleh factor perangsang koloni yang mengendalikan produksi megakariosit.

Trombosit mempunyai beberapa ciri fungsional sebagai sebuah sel, walaupun tidak mempunyai inti dan tidak dapat berreproduksi. Didalam sitoplasmanya terdapat factor – factor aktif seperti (1) molekul aktin dan myosin, sama seperti yang terdapat dalam sel – sel otot, yang menyebabkan trombosit dapat berkontraksi; (2) sisa – sisa retikulum endoplasma dan apparatus Golgi yang mensintesis berbagai enzim dan menyimpan sejumlah besar kalsium; (3) system enzim yang mampu membentuk ATP dan ADP; (4) system enzim yang mensintesis prostaglandin, yang merupakan hormone – hormone setempat yang menyebabkan berbagai jenis reaksi pembuluh darah dan reaksi jaringan setempat lainnya; (5) suatu protein penting yang disebut factor pemantap fibrin (*fibrin stabilizing factor*); dan (6) factor pertumbuhan (platelet-derived growth factor, PDGF) yang dapat menyebabkan penggandaan dan pertumbuhan sel endotel pembuluh darah, sel – sel otot polos pembuluh darah dan fibroblast, sehingga dapat menimbulkan pertumbuhan sel – sel untuk memperbaiki dinding pembuluh yang rusak.<sup>23,24</sup>

Trombositopenia adalah kondisi dimana konsentrasi trombosit kurang dari 150.000 per mm<sup>3</sup> darah yang bersirkulasi, dan hal ini terjadi karena terdapat ketidak-seimbangan antara siklus produksi normal dan siklus penghancuran. Etiologi trombositopenia dapat diklasifikasikan menjadi defek pada produksi atau destruksi platelet. Penurunan produksi platelet terjadi jika hati gagal memproduksi trombopoietin yang cukup atau sumsum tulang gagal memproduksi persediaan platelet yang memadai. Kondisi ini sering dijumpai pada penderita kanker, termasuk infiltrasi sumsum tulang dari sel kanker atau infeksi myelosupresi

karena kemoterapi, dan penyakit hati. Peningkatan penghancuran, karena *idiopathic thrombocytopenic purpura* (ITP) atau *disseminated intravascular coagulation* (DIC), dan sekuestrasi limpa juga merupakan penyebab terjadinya trombositopenia.<sup>62,63</sup>

## 2.6. PHALERIA MACROCARPA

*Phaleria macrocarpa* merupakan *nomenclature binomial* dari mahkota dewa dan termasuk dalam familia Thymelaeaceae. Umumnya dapat mencapai puluhan tahun dengan masa produktif 10-20 tahun. Tanaman ini dapat dijumpai tumbuh liar di daerah hutan pada ketinggian 10-1200 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan sekitar 1000-2500 mm/tahun.

*Phaleria macrocarpa* merupakan tumbuhan perdu dan dapat mencapai ketinggian 1-1,5 meter. Daunnya termasuk daun tunggal yang saling berhadapan, warna hijau, dengan panjang 7-10 cm dan lebar 3-5mm. Bunga berwarna putih, tergolong bunga majemuk tersusun dalam kelompok 2-4 bunga. Buah terdiri dari kulit, daging, cangkang, dan biji. Ketebalan kulit buah 0,5-1,0 mm, tebal daging bervariasi. Cangkang berwarna putih dengan ketebalan mencapai 2 mm. Biji berbentuk lonjong dengan garis tengah 1 cm. Akar termasuk akar tunggang, batang bentuk bulat.<sup>28</sup>

Ekstrak terhadap daging buah dan kulit biji *phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya zat aktif polyphenol, alkaloid, terpenoid, dan saponin. Pengujian terhadap toksisitas ekstrak tanaman dilakukan dengan melihat tingkat mortalitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach setelah diinkubasi selama

24 jam. Hasilnya toksisitas sangat tinggi, dengan nilai konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva udang (LC50) berkisar antara 0,1615 – 11,8351 µg/ml (semakin kecil nilai LC50, semakin toksik tanaman tersebut dan semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi / efek farmakologi), dengan batas aktifitas biologi tanaman adalah  $LC50 < 1000 \mu\text{g/ml}$ .<sup>65,66</sup>

Polyphenol dalam tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF-κB), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin.<sup>67</sup> Pada penelitian yang dilakukan Tomita M dkk dari Ohio USA, dilaporkan bahwa sifat immunosupressif polyphenol terhadap TH1 CD4 adalah hambatan dalam ekspresi gen IL-2 dan IFN-γ.

Penelitian lain di Jepang, yang meneliti efek kandungan *polyphenol* dalam tanaman obat (*tea polyphenols*) mengemukakan bahwa *polyphenol* akan menstimulasi pelepasan TNF-α dan IFN- γ oleh sel *T-helper*. TNF-α ini mempunyai peran penting dalam apoptosis sel, dimana apoptosis sel akan dimulai dari *Fas / TNF-RI receptor*.<sup>49,50,53</sup> Di Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India beberapa peneliti – yang meneliti efek kandungan polyphenol pada herbal medicine – mengemukakan bahwa poliphenol alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon-γ (IFN- γ) dalam suatu populasi immunosit, yang sangat penting dalam memacu aktivasi CTL's dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker.<sup>68</sup> Sel imun yang berperan besar dalam perondaan imun terhadap kanker adalah CTL, Sel-NK (*Natural Killer*). Setelah sel kanker dikenal

sebagai sel asing, sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan *perforin* dan *granzyme*, di mana *perforin* ini sebagai *pore forming* untuk memasukkan *granzyme* ke dalam sitosol. Akibat aktifitas sel-sel efektor immune tersebut maka sel-sel target akan mengalami apoptosis.<sup>57,58</sup>

Penelitian dengan menggunakan sel kanker esofagus (TE-1) terlihat bahwa *gallic acid* (GA : *3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) , senyawa aktif polyphenol yang terkandung dalam ekstrak daging dan kulit buah *Phaleria macrocarpa*, akan meningkatkan protein pro apoptosis Bax dan menurunkan protein anti apoptosis Bcl-2 serta Xiap. GA juga akan mengurangi *survival* dari *pathway* Akt/mTOR yang akan meningkatkan inisiasi apoptosis. Tetapi sebaliknya pada sel non-kanker (CHEK-1) terjadi hambatan protein pro apoptosis dan tidak terjadi penurunan ekspresi protein *survival*. *Phaleria macrocarpa* juga tidak mengganggu siklus sel serta akan meningkatkan apoptosis pada sub-populasi fase G1, sehingga diperkirakan bahwa *Phaleria macrocarpa* tidak berbahaya bagi sel normal. Jadi *phaleria macrocarpa* tidak hanya bekerja secara spesifik pada saat sel mengalami mitosis.<sup>29</sup>

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa Ekstrak etanol biji mahkota dewa memiliki aktivitas sitotoksik dan menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D melalui penghambatan ekspresi protein COX-2.<sup>37</sup> Aktivitas sitotoksik ini mempunyai nilai IC50 sebesar  $15,12 \pm 3,21$   $\mu\text{g/ml}$  dan menghambat aktivitas proliferasi sel kanker payudara T47D sehingga nilai *doubling time*-nya memanjang dari  $27,89 \pm 0,46$  jam menjadi  $53,62 \pm 1,14$  jam pada konsentrasi

3,125  $\mu\text{g/ml}$  dan menjadi  $37,73 \pm 2,65$  jam pada konsentrasi 1,5625  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak etanol biji mahkota dewa juga menghambat ekspresi COX-2 dengan nilai IC50 sebesar  $17,07 \pm 0,77$   $\mu\text{g/ml}$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji mahkota dewa (*P. macrocarpa*) bersifat sitotoksik dan menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D melalui penghambatan ekspresi protein COX-2.

Penelitian yang dilakukan oleh Selamat B dkk pada mencit C3H yang menderita adenocarcinoma mamma, dan diberikan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan pelarut ethanol melalui cara sokletasi, pada perlakuan selama 3 minggu dengan dosis 0,0715 mg / hari atau setara 5 gram crude / hari yang sudah diberikan pada manusia, mendapatkan hasil bahwa ekspresi perforin CTL dan sel-NK serta indeks apoptosis sel tumor (dengan pengecatan HE) mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol, dan terjadi hambatan pertumbuhan diameter tumor yang signifikan. Pada pemberian dosis sampai dengan 0,0140 mg/hari tidak ditemukan adanya toksisitas / kerusakan organ vital seperti ginjal, hepar, lien, dan otot jantung.<sup>38,39</sup>

Penelitian lain oleh Selamat B dkk terhadap ekspresi VEGF tumor pada pemberian secara kombinasi Adriamycin, cyclophosphamide dan ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari dengan pelarut ethanol terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok yang diberi ekstrak dan tidak menyebabkan peningkatan SGOT dan SGPT yang bermakna, serta tidak ditemukan adanya toksisitas/kerusakan organ vital seperti ginjal, hepar, lien, dan otot jantung, serta lekopenia.<sup>38-40</sup>

Dari penelitian – penelitian diatas, dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Phaleria macrocarpa* dapat digunakan sebagai zat ajuvant sitostatika, dan dapat bersinergi dengan *Adriamicyn* dan *Cyclophosphamide* karena mempunyai cara kerja yang sejenis, dimana diharapkan dapat memberikan hasil yang maksimal pada efek apoptosis sel kanker, serta memberikan efek samping yang minimal.