

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Karsinoma Mammariae**

Pada Jurnal Patologi tahun 2010, disebutkan bahwa kanker payudara adalah keganasan epitelial yang paling banyak terjadi pada wanita dan penyebab kematian kedua setelah kanker paru. Disebutkan pula bahwa didapatkan data 54.000 kasus baru karsinoma in situ dan 207.000 karsinoma invasif payudara didiagnosis di United States, lebih dari 1.000.000 kasus muncul di seluruh dunia pertahun. Sementara itu, di negara yang sama terjadi kematian pada sebanyak 39.500 wanita karena kanker payudara.<sup>21</sup>

Kanker payudara paling banyak terjadi pada wanita dengan estrogen reseptor positif (ER)-positif.<sup>22,23</sup> Kanker payudara banyak dideteksi selama masa reproduksi, meningkat saat usia puber, lebih tinggi pada usia menopause, tingkatnya berhenti setelah itu. Bagaimanapun juga, kanker payudara dapat berkembang pada segala usia, mulai anak-anak sampai usia tua. Kanker yang muncul pada usia tua, tidak berbeda bermakna secara morfologis maupun dasar molekuler dibandingkan kelompok usia yang lain.<sup>24</sup>

Insiden kanker payudara dan jumlah kematian penderita dapat turun dengan adanya deteksi dini kanker payudara yang efektif. Di United States, insidensi meningkat tajam setelah adanya deteksi dini dengan mammografi.<sup>24</sup>

Kebanyakan kasus kanker payudara, telah diketahui lokasi benjolan, ukuran benjolan dengan diameter kurang dari 2 cm dan atau in situ. Sampai sekarang, peningkatan kejadian kanker payudara ini tidak meningkatkan juga usia harapan hidupnya. Buktinya adalah bahwa rata-rata usia kematian berubah sangat sedikit, yang tidak signifikan mulai tahun 1930 sampai 1990.<sup>20</sup>

Biologi molekuler dalam progresifitas kanker payudara, penting artinya bagi pencarian target terapi yang spesifik dan efektif. Peningkatan pengetahuan tentang patologi molekuler kanker payudara dapat diintegrasikan dan diimplementasikan pada praktek klinis dan kemudian memberikan arti menurunkan angka kejadian dan kematian akibat kanker payudara.<sup>25</sup>

### **2.1.1. Terapi**

Penanganan keganasan secara medis, termasuk kanker payudara, umumnya meliputi 3 macam, yaitu : pembedahan, radiasi dan kemoterapi (termasuk terapi hormonal). Terapi hormonal diberikan karena adanya bukti bahwa kejadian keganasan payudara faktor mempengaruhi terbesar adalah hormon estrogen.<sup>22</sup>

Diketahui terdapat jenis terapi lain yaitu secara biologis, yang meliputi imunoterapi, agen differensiasi, dan agen dengan target biologi sel kanker.<sup>26</sup> Terapi biologis, pada prinsipnya adalah memanipulasi interaksi antara sel kanker dengan pertahanan host. Salah satu target spesifik yang dikembangkan saat ini adalah agen-agen yang dapat mempengaruhi apoptosis (tahap preklinis). Untuk mengetahui agen tertentu berefek spesifik terhadap target molekuler tertentu, masih perlu pemeriksaan yang spesifik untuk menentukan titik dan mekanisme

kerjanya, optimalisasi kerja molekul utama sampai dengan aplikasi in vivo yang non toksik.<sup>27</sup>

Ukuran tumor merupakan suatu hal yang dapat diukur untuk menilai respon terapi.<sup>28</sup> Salah satu kepentingan ukuran tumor, juga merupakan variabel prognosis dalam kasus karsinoma invasif payudara. Ukuran tumor berhubungan juga dengan peningkatan probabilitas metastasis regional, keterlibatan kelenjar limfe aksila, dan peningkatan rekurensi.<sup>29,30</sup>

Beberapa hasil penelitian tentang hubungan ukuran tumor dan indeks apoptosis menunjukkan hasil bermakna, sehingga sangat menarik untuk mengetahui ekspresi protein-protein yang menyusun apoptosis yang diinduksi oleh suatu obat sitotoksik, antara lain p53 dan Bcl-2.<sup>31</sup>

## **2.2. p53**

Penemuan pertama protein p53 adalah pada tahun 1979 dikatakan oleh Crawford pada tahun 1983 sedangkan penurunan kadar protein p53 pertama kali dilaporkan 10 tahun kemudian tahun 1989. Protein p53 mulai populer dikenal sebagai “molecule of the year” pada tahun 1993 oleh Harris. Hal tersebut dikarenakan adanya observasi terhadap kejadian-kejadian kanker pada manusia, menunjukkan peningkatan ekspresi p53 mutan meningkatkan kemungkinan diagnosis dan terapi klinis. Sudut pandang ilmuwan menunjukkan dengan jelas pentingnya p53 *signalling pathways* dalam sel *surveillance* setelah kejadian stress (Vogelstein et al., 2000).<sup>32</sup> Regulasi jaringan ini mengintegrasikan berbagai sinyal stres untuk menghasilkan up-regulasi p53 aktif dan berbagai efek termasuk apoptosis, pertumbuhan dan perbaikan kerusakan DNA.<sup>33</sup>

p53 adalah protein utama dalam respon kerusakan DNA dan merupakan bagian dari regulasi jaringan gen yang luas dan kompleks. Protein p53, oleh Lane pada tahun 1992, dikenal sebagai “Guardian of the genome”, oleh Vousden tahun 2000 disebut sebagai “Death star” dan disebut sebagai “Good and bad cop” oleh Sharpless dan DePinho tahun 2002.<sup>33</sup>

Peraturan stabilitas p53 adalah proses sentral dalam mengendalikan fungsi p53. Proses degradasi p53 telah diselidiki intensif dan p53 telah diketahui memainkan peran penting dalam sel karena jika tidak berfungsi dengan benar akan menghasilkan kanker. Pada studi lain, didapatkan p53 disfungsi dalam sebagian besar jenis kanker<sup>34</sup> dan juga ditemukan bahwa p53 yang berbeda mutasi telah ditemukan pada  $\geq 18000$  kanker.<sup>35</sup> Pada eksperimen tikus secara genetik yang direkayasa untuk kekurangan gen p53 menunjukkan umur lebih singkat karena peningkatan kerentanan terhadap tumor.<sup>36</sup>

Telah disebutkan di atas bahwa, protein p53 adalah simpul utama dari jaringan yang berfungsi untuk menerapkan "rem" pada multiplikasi sel dan dalam kasus tertentu menyebabkan apoptosis. Fungsi utama itu adalah untuk bertindak sebagai faktor transkripsi. Dalam sel tanpa stressor, konsentrasi normal p53 yang disimpan sangat rendah. Ketika stres terjadi, anggota jaringan berinteraksi untuk menghasilkan 3-10 kali lipat peningkatan konsentrasi p53 yang diaktifkan.<sup>36,37</sup> Proses ini sangat cepat dengan tingkat p53 yang naik dalam beberapa menit dan dalam beberapa jam kemudian terjadi peristiwa apoptosis pada beberapa jenis sel yang pertama.<sup>38,39</sup>

Pada jalur apoptosis, p53 mentranskripsi sejumlah besar protein yang

terlibat pada jalur intrinsik dan ekstrinsik apoptosis.<sup>40,41</sup> Termasuk protein dari *family* Bcl2, *death domain protein*, protein yang menginduksi spesies oksigen reaktif, efektor apoptosis protein p53 pada membran plasma terkait dengan PMP-22(PERP), antagonis faktor *survival* protein *insulin-like growth factor binding* protein 3 (IGFBP3) dan protease apoptosis aktivator faktor mengaktifkan apoptosis satu (APAF1).<sup>42</sup> Bax, anggota Bcl-2 *family*, adalah faktor apoptosis pertama yang harus diidentifikasi sebagai target untuk *transactivation* p53.<sup>43</sup>

Pada kejadian *growth arrest*, p53 mentranskripsi gen yang berkontribusi memblokir siklus pembelahan sel. Telah ditunjukkan bahwa p53 *essential* untuk sel siklus *arrest* berkepanjangan yang disebabkan oleh ionisasi radiasi, tapi lebih pendek, sel *cycle arrest* yang awal, adalah p53 independen.<sup>44</sup> p21Waf1/Cip1 adalah protein ditranskripsi oleh p53 yang menonjol memainkan peran kritis sebagai pemelihara penangkapan siklus sel (el Deiry et al., 1993). Sekarang dipercaya bahwa periode singkat stagnasi sel disebabkan oleh Chk1 mengikat Cyclin D1, dengan ATM Chk1 mungkin mengaktifkan.<sup>44</sup>

Tumor membutuhkan adanya bahan baku yang memiliki kontak dengan sejumlah besar pembuluh darah, untuk dapat bertahan hidup, sehingga tumor mengirimkan sinyal kimia yang mendorong pertumbuhan pembuluh darah baru. Tampak bahwa, bila ada p53, pembentukan pembuluh darah baru dihambat (*angiogenesis inhibition*) dalam tumor oleh aktivasi atau represi dari gen yang mengatur pembentukan pembuluh darah baru.<sup>33</sup>

Protein p53 juga berpartisipasi dalam perbaikan kerusakan DNA (stabilisasi genetik), meskipun mekanisme tidak jelas dipahami. p53 mentranskripsi gen

target seperti DDB2 (P48), GADD45<sup>33</sup> dan p53R2<sup>45</sup>, yang penting dalam regulasi nukleotida-eksisi perbaikan DNA, rekombinasi kromosom dan segregasi.<sup>40</sup> Sel-sel yang kurang p53 telah menunjukkan tidak ada perbaikan eksisi nukleotida<sup>33</sup> dan perbaikan dasar eksisi kurang efisien.<sup>46</sup> p53 sendiri juga memainkan peran dalam stabilitas genetik dengan terminus C-p53 mengikat berbagai bentuk kerusakan DNA.<sup>47-58</sup>

### 2.3. Bcl-2

Protein dari keluarga-2 Bcl merupakan regulator kunci dari jalur apoptosis mitokondria. Protein-protein tersebut mengendalikan permeabilisasi membran luar mitokondria (*mitochondrial outer membrane*=MOM) yang melepaskan sitokrom c dan faktor apoptosis lainnya ke dalam sitosol. Hal ini menyebabkan aktivasi cascade caspase yang dianggap sebagai *point of no return* dalam program kematian sel. Regulasi apoptosis oleh protein Bcl-2 penting untuk homeostasis jaringan, untuk pengembangan embrio dan untuk pematangan sel-sel darah.<sup>48</sup> Suatu hal yang penting, deregulasi protein Bcl-2 memiliki peran mayor dalam pembentukan tumor dan dalam tanggapan selular terhadap terapi antikanker. Keluarga Bcl-2 juga terlibat dalam penyakit lain, seperti autoimun, infeksi dan gangguan neurodegeneratif. Di sisi lain, ada peningkatan bukti bahwa keluarga protein Bcl-2 juga memiliki fungsi tambahan lainnya dalam proses seluler, seperti dalam mitokondria dan metabolisme, yang sebagian besar tetap belum dapat diketahui.<sup>49</sup> Selama 25 tahun terakhir, keluarga protein Bcl-2 banyak diteliti karena relevansi biologis dan potensi sebagai target terapi. Telah 20 atau lebih anggota keluarga protein Bcl2 telah diidentifikasi dan diklasifikasikan

menurut fungsinya dalam apoptosis.<sup>50</sup> Telah didefinisikan 3 subkelompok protein Bcl2 :

- (i) prosurvival Bcl-2 protein, seperti Bcl-2 itu sendiri, Bcl-xL, Bcl-w, MCL-1 dan A1, yang menghambat kematian sel melalui interaksi langsung dengan anggota proapoptosis,
- (ii) para algojo Bax dan Bak, yang diyakini untuk berpartisipasi langsung dalam permeabilisasi IBU; dan
- (iii) BH3-satunya protein, yang berbagi motif umum disebut domain BH3 dan telah berevolusi untuk merasakan tekanan yang berbeda dalam sel dan untuk memulai apoptosis. BH3-satunya protein telah lebih diklasifikasikan sebagai 'Sensitizer/derepressors', seperti Noxa, BFM atau Bik, yang hanya bisa berinteraksi dengan anggota prosurvival dan memusuhi fungsi mereka, dan 'aktivator langsung', seperti Bid dan Bim, yang selain memiliki kemampuan untuk langsung mengaktifkan Bax dan Bak. Dalam kondisi normal, protein BH3-satunya tidak aktif atau berada pada tingkat rendah dalam sel. Di hadapan rangsangan apoptosis mereka diaktifkan oleh pasca-translasi modifikasi atau ekspresi mereka meningkat untuk menginduksi apoptosis.<sup>51</sup> Sebagai hasil dari BH3-satunya stimulasi, dan Bax Bak menjadi aktif. Telah diamati bahwa setelah mereka aktivasi selama apoptosis, translocates Bax dari sitosol ke MOM.<sup>52</sup>

Bax dan Bak yang konstitutif terikat pada konformasi, perubahan IBU, masuk ke dalam membran, oligomerize dan menginduksi pelepasan sitokrom C. Khususnya juga beberapa anggota antiapoptotik Bcl-2 telah terbukti mentranslokasi dan memasukkan ke MOM stimulus apoptosis. Dalam skenario ini, prosurvival Bcl-2

protein menghambat permeabilisasi IBU oleh interaksi langsung dengan anggota proapoptotik.<sup>52,53</sup>

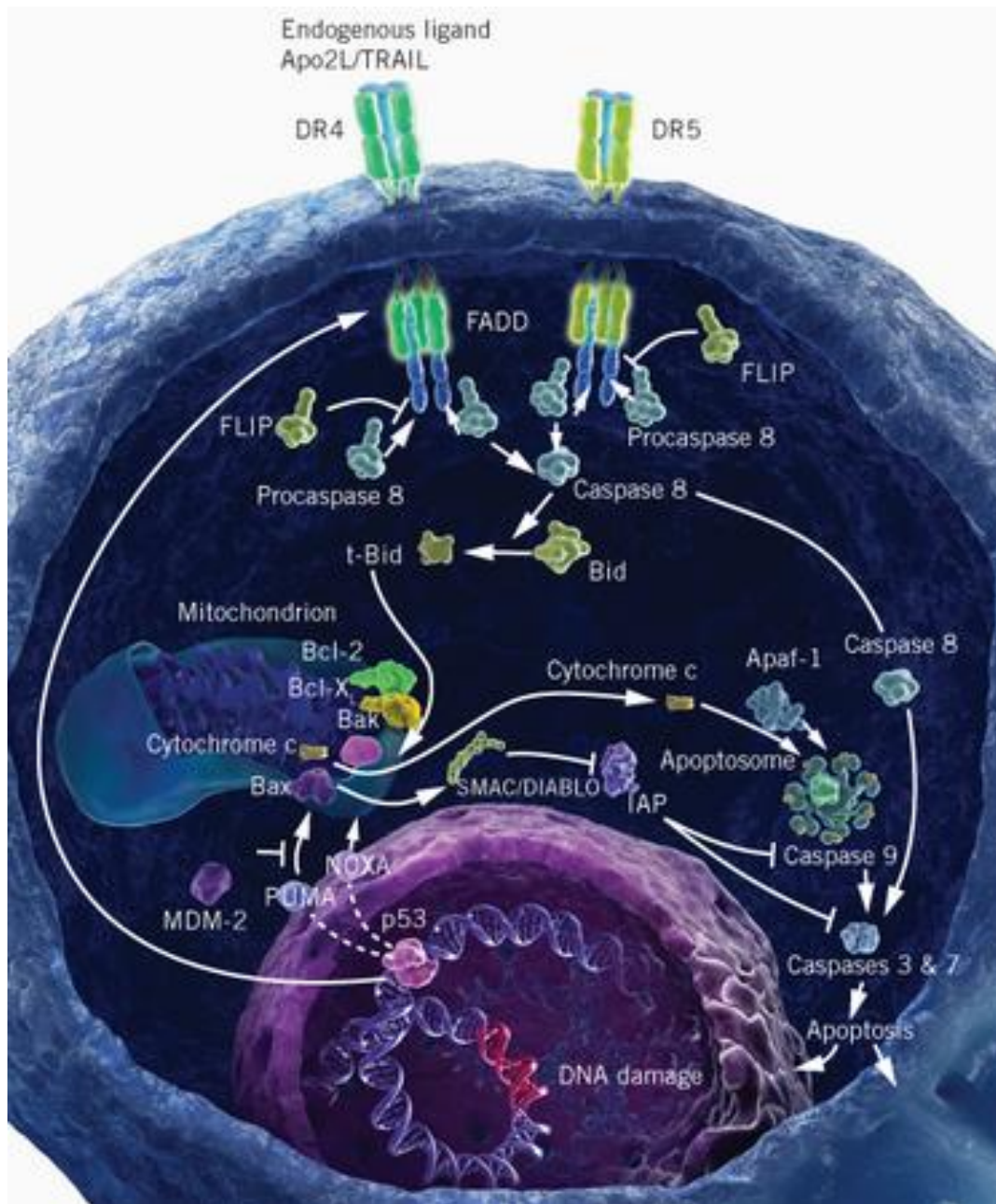
Protein dari keluarga Bcl-2 mengatur apoptosis (*programmed cell death*). Meskipun belum jelas bagaimana kelompok keluarga protein Bcl-2 ini mengontrol apoptosis, Bcl-2 dan *family* nya jelas memiliki kapasitas untuk mengatur permeabilitas membran intraseluler terhadap ion dan protein. Anggota keluarga proapoptotik dari Bcl-2, terutama Bax dan Bid, telah dianalisis secara luas pada kemampuannya membentuk *channels* dalam membran dan untuk mengatur *preexisting channels*. Anggota anti-apoptotik dari *family* tampaknya memiliki efek berlawanan dalam formasi *membrane channel*.<sup>53</sup>

Bcl-2, prototype dari anggota keluarganya, terlokalisir di retikulum endoplasma (ER) dan mitokondria. Dengan menguji kontribusi dari ER menempatkan Bcl-2 pada regulasi apoptosis. Diidentifikasi ada 2 jalur kematian sel yang berbeda :

1. Jalur yang ditandai dengan awal hilangnya potensial membran dalam mitokondria dan dihambat oleh ER lokasi Bcl-2.
2. Jalur yang tidak dihambat oleh ER tempat Bcl-2, tetapi ditandai oleh translokasi mitokondrial dari *cytoplasmic pro-apoptotic* protein Bax.

Pada mitokondria oligomerisasi Bax menginduksi pelepasan cytochrome c. Jalur mitokondrial ini, diikuti oleh ekspresi dari onkogen *Myc*, secara specific, *Myc* ditemukan pada transisi monomeric, ikatan membran, Bax sampai *oligomeric active* Bax. Ditemukan pula bahwa fungsi Bcl-2 pada ER tergantung pada *apoptotic agonist*.





Gambar 1. Jalur Lengkap Apoptosis

<http://www.biooncology.com/images/biological-pathways/apoptosis-image-lg.png>

#### 2.4. Danshen

Danshen adalah ekstrak akar kering *Salvia miltiorrhizae* Bunge, yang sangat terkenal sebagai obat herbal tradisional China sebagai obat penyakit kardiovaskuler dan serebrovaskuler serta terdaftar dalam Pharmacopoeia China. Danshen telah diteliti secara farmakologis baik di dalam negeri yaitu China, juga diluar negeri seperti Eropa (PEFOT), Amerika (FDA), Korea, Australia, dll.<sup>58</sup>

Danshen, diproses dari akar kering *S. miltiorrhizae*, yang merupakan satu dari herbal komersial terpenting di China. Gambaran umum dari Danshen adalah tanaman dengan bunga yang abadi, genus *Salvia*, bernilai tinggi pada akarnya dalam pengobatan tradisional China, merupakan tumbuhan asli China dan Jepang, tumbuh pada ketinggian 90-1200m di atas permukaan laut, tumbuh setinggi 30-60cm, daun sederhana atau terbelah tergantung posisi daun pada batang. Bunga *S. miltiorrhizae* berwarna ungu atau biru berada diantara batang.<sup>58,59</sup>



Gambar 2. Daun dan bunga *Salvia miltiorrhizae* bunge

Spesifikasi *miltiorrhizae* berarti “ekstrak jus merah dari akar “, dikatakan oleh Clebsch et al., tahun 2003. Danshen merupakan satu dari herbal China yang paling serba guna. Kadang dideskripsikan sebagai sage Chinese atau akar sage merah.<sup>59</sup>



Gambar 3. Akar merah *Salvia miltiorrhizae bunge*

Danshen sering digunakan dalam pengobatan China kuno, sampai menjadi bahan pengobatan herbal penting dalam praktek pengobatan China modern. Biasanya digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit kardiovaskuler seperti *atherosclerosis*, atau *blood clotting abnormal*, hiperlipidemia dan penyakit cerebro-vascular di seluruh dunia, data dari Cheng et al., tahun 2007.<sup>59</sup>



Gambar 4. Danshen adalah akar kering *S.miltiorrhiza*

Kemampuan *S. miltiorrhiza* untuk “menipiskan” pembuluh darah dan mengurangi *blood clotting* telah diketahui, tetapi *S. miltiorrhiza* juga dapat menghambat fungsi trombosit, sehingga tidak boleh digunakan pada pasien dengan penyakit perdarahan, kelainan pembekuan darah, terutama pada prosedur bedah, atau ketika minum obat antikoagulasi, baik herbal ataupun suplemen.

Kadang *S.miltiorrhiza* digunakan sebagai *single herb remedy*, dengan bentuk injeksi intra vena. Perlu adanya analisis komprehensif serta identifikasi secara farmakologis tentang molekul yang penting dan juga penelitian biokimia dan farmakologis.<sup>58,59</sup>

#### 2.4.1. Kandungan Bahan Kimia dalam *Salvia miltiorrhizae Bunge*

Sampai sekarang menurut Yong et al. pada tahun 2009, telah diketahui, terdapat lebih dari 70 unsur yang diisolasi dan diidentifikasi dari *S. miltiorrhiza* dengan berbagai konsentrasi.<sup>59</sup>

Tabel 2. Komponen utama *S. miltiorrhiza* dapat dibagi menjadi 2 group.

Hydrophilic compounds	Lipophilic chemicals
sal-vianic acid A,B,C	tanshinone I ,IIA,IIB, V, VI
salvianolic acid A,B,C,D,E,G	cryptotanshinone
rosmarinic acid	isotanshinone I ,II,IIB
methyl rosmarinate	isocryptotanshinone
monomethyl lithospermater	hydroxytanshinone IIA
dimethyl lithospermate	methyl tanshinonate
ethy lithospermate	dan-shenxinkum A,B,C,D
lithospermic acid B	dihydroi-sotanshinone I
protocaterchualdehyde	neocryptotanshinone
isoferulic acid	deoxyneocryptotanshinone
baicalin	salviol
isomperatorin	nortanshinone
ursolic acid	Tanshindiol A,B,C
$\beta$ -stiosterol	miltirone
daucosterol	1-dehy-dromiltirone
stigmasterol	1-dehydrotanshinone II A
tigo-genin	1-detoisocryptotanshinone
5(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3-benzofurancarbaldehyde	3 $\alpha$ -hy-droxytanshinone II A

Hydrophilic compounds	Lipophilic chemicals
	1,2-dihydrotan-shinqiunone
	formyltanshinone
	methylenedihydrotanshinone
	7 $\beta$ -hydroxy-8-13-abietadiene 11, 12-dione
	ferruginol
	4-methylenemiltirone
	tanshinlactone
	dihydrotanshinlactone
	danshen-spiroketallactone
	epidanshenspiroketallac-tone
	cryptoac-etalide
	miltiodiol
	miltipolone
	nor-salvioxide
	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone I
	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione

Berbagai efek aktifitas antibakteri, antioksidan, antitumor, pencegah angina pectoris dan infark miokard, ditemukan pada Tanshinone I, Tanshinone IIA dan Cryptanshinone, yang merupakan bioaktif mayor dalam *S.miltiorrhiza*. Tanshinone merupakan bahan kimia yang unik dan tidak ditemukan pada berbagai herbal China yang lain.<sup>58,59</sup>

Penelitian yang terdahulu tentang Danshen, diperoleh hasil bahwa Danshen memiliki efek sebagai : *anti-platelet* oleh Chan, tahun 2001 dan Yu et al., tahun 1997, *cardio protective* oleh Au-Yeung et al., tahun 2001; Fu et al., tahun 2007; Wu et al., tahun 1993, *anti-inflammatory* oleh Kim et al., tahun 2002, *hepato-protective* (Lee et al., 2003), *vasodilatory effects and diminution of cancer cell proliferation* (Lee Chen et al., 2008; Liu et al., 2001) , dalam penelitian preklinis. Telah dilaporkan juga bahwa Danshen, telah dapat diperoleh di 16 negara dan menjadi obat Chine pertama yang diakui Food and Drug Administration untuk tes klinis di United States.<sup>58,59</sup>

Komponen hidrofilic *S.miltiorrhiza* terdiri dari *phenolic acid* komponen, termasuk *single phenolic acids* dan *polyphenolic acids*. *Single phenolic acids* termasuk di dalamnya *protocatechuic aldehyde*, *protocatechuic acid*, *caffeic acid*, dan *3,4-dihydroxyphenyl lactic acid*, yang disebut danshensu, sedangkan *polyphenolic acids* termasuk *rosmarinic acid*, *lithospermic acid*, *salvianolic acid A*, *salvianolic acid B*, dan *salvianolic acids* yang lain (Jing et al., 2008). Telah diketahui pula bahwa, Salvianolic acid A yang diisolasi, menunjukkan kapasitas efek antioxidant yang lebih tinggi dibandingkan salvianolic acid B. *S. miltiorrhiza*, memiliki efek aktifitas sebagai *scavenging* radikal bebas yang lebih kuat dibanding vitamin E. Komponen anti oksidan mayor *S. miltiorrhiza*, yaitu *salvianolic acid A* dan *salvianolic acid B* juga memiliki banyak keuntungan.<sup>59</sup>

#### **2.4.2. Toksisitas *Salvia miltiorrhiza***

Dalam *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, direkomendasikan dosis terapi adalah 9-15 gram per hari dalam bentuk sediaan rebusan. Dalam beberapa kasus, disarankan dosis yang lebih tinggi, lebih dari 20g per hari, untuk obat inflamasi termasuk viral hepatitis. Berdasarkan *English-Chinese Rare Chinese Materia Medica*, dosis lebih dari 30-60 g per hari dapat digunakan dalam kasus angina dan *heat-type arthritis*. Pada dosis yang tinggi, *S. miltiorrhiza* menyebabkan mulut kering, *dizziness*, *lassitude*, *numbness*, *shortness of breath* dan gejala atau tanda lain yang biasanya muncul spontan dan hilang spontan tanpa perlu stop obat.<sup>58</sup>

*S. miltiorrhiza* tidak untuk pasien dengan tendensi perdarahan dan tidak boleh digunakan bersama-sama dengan warfarin (coumadin), karena akan

meningkatkan efek antikoagulan. *S. miltiorrhiza* memiliki tingkat toksisitas yang rendah (*low acute toxicity*) pada Lethal Dose 50 dengan sediaan injeksi yaitu pada dosis 40-80 g/kgBB. Dosis-dosis tersebut didapatkan berdasar *scientific research*, publikasi ataupun penggunaan tradisional.<sup>58,59</sup>

### **2.4.3. Aktifitas Farmakologis *Salvia miltiorrhizae* Bunge**

#### **1. Aktifitas Antikanker**

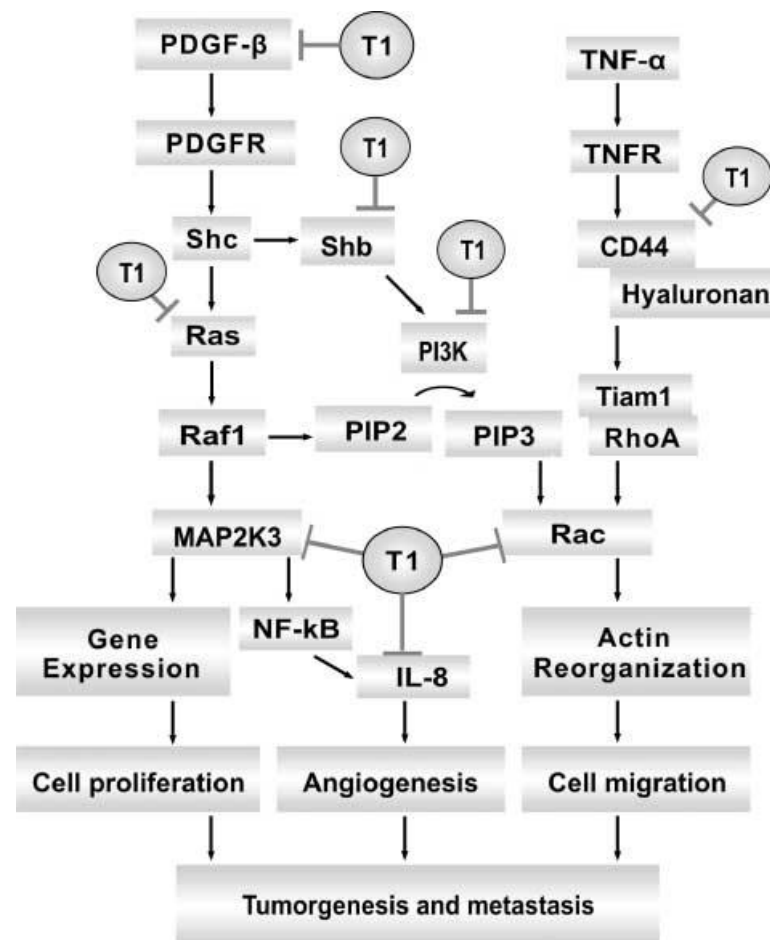
Banyak observasi telah dilakukan, dengan hasil : tampak adanya efek antikanker dari *S.miltiorrhiza* dan komponennya. Diantara 76 tanaman obat, didapatkan bahwa *tanshinone* IIA adalah satu yang menjanjikan memiliki efek unsur *cytotoxic* pada sel leukemia manusia, ditemukan pada penelitian Efferth et al. tahun 2008. Zhou et al. tahun 2005 menemukan bahwa *tanshinone* IIA, yang diekstrak dari akar kering *S. miltiorrhiza*, merupakan satu yang memiliki efek potential sebagai antikanker, meskipun pada aplikasi tradisional sebagai obat penyakit cardiovascular di China. Demikian juga Wu et al. tahun 1991 dan Ryu et al.tahun 1997 juga mendapati bahwa dalam eksperimen menunjukkan *tanshinone* IIA memiliki efek *cytotoxic* pada sel tumor manusia. Penelitian Yuan et al. tahun 1998 dan 2004, Sung et al. tahun 1999 dan 2005, serta Liu et al. tahun 2006 dan Wang et al. tahun 2007 mengungkap bahwa induksi apoptosis adalah faktor kunci yang memiliki kontribusi terhadap *cytotoxic property* dari *tanshinone* IIA. Penelitian Whu dan Kavanagh tahun 2003 menunjukkan bahwa *tanshinone* memicu jalur apoptosis sehingga dianggap merupakan satu jalur strategis sebagai terapi antikanker. Demikian potensi anti-kanker *tanshinone* IIA telah diketahui.<sup>59</sup>

Mekanisme *S. miltiorrhiza-induced* apoptosis pada hepatoma HepG2 sel manusia mengindikasikan bahwa *S. miltiorrhiza* menekan *intracellular thiols*,

yang akan menyebabkan MPT (*mitochondria permeability transition*) dan berikutnya meningkatkan generasi ROS (Reactive oxygen species) dan akhirnya sel apoptosis, mati, diungkapkan dari penelitian oleh Liu et al. tahun 2001. Neotanshinlactone yang diisolasi dari *S. miltiorrhiza* secara *in vitro* dapat melawan beberapa sel kanker manusia. Efek inhibisi juga didapatkan signifikan terhadap 2 macam sel kanker payudara manusia yang lebih potent dibandingkan tamoxifen citrate, juga potensial inhibisi dari ekspresi yang berlebihan reseptor estrogen sel kanker payudara, sebagai obat anti-kanker payudara diungkapkan oleh Wang et al. tahun 2004. Lebih lanjut, beberapa penelitian yang berkaitan dengan neoplasma, pada kanker kolon manusia, disebutkan sel Colo 205 terkena efek tanshinone I dengan hasil adalah bahwa tanshinone I menginduksi apoptosis pada sel Colo 205 melalui 2 jalur, yaitu *mitochondrial-mediated intrinsic cell-death pathways* dan *p21-mediated G0/G1 cell cycle arrest*, hal ini diungkapkan dari penelitian Su et al. tahun 2008. Di samping yang telah disebutkan di atas, efek antikanker tanshinones pada sel adenocarcinoma paru yang *highly invasive*, CL1-5 telah diteliti oleh banyak peneliti. Tanshinone I secara signifikan menghambat migrasi, invasi, dan aktivitas *gelatinase* pada *macrophage-conditioned medium-stimulated CL1-5 cell in vitro* dan juga menurunkan tumorigenesis dan metastasis pada tikus yang imunodefisiensi kombinasi dengan CL1-5 (*adenocarcinoma paru highly invasif*). Efek ini dimediasi melalui *interleukin-8*, *Ras-mitogen-activated protein kinase*, dan *Rac1 signaling pathways*, hal ini diungkapkan pada penelitian Lee et al. tahun 2008.<sup>59</sup>



Sekali lagi disebutkan bahwa, bahan aktif Danshen yang larut lemak, antara lain adalah tanshinone dengan berbagai derivatnya, seperti tanshinone I, tanshinone IIA, cryptanshinone, dll, telah diteliti. Sebagai contoh adalah efek tanshinone I terhadap kanker paru, pada gambar di bawah ini dapat dilihat mekanisme kerja tanshinone I.<sup>59</sup>



Gambar 5. Jalur Regulasi Tanshinone I

Hipotesis efek tanshinone I pada tumorigenesis dan metastasis tampak pada Ras-MAPK dan Rac1 *signaling pathways*. Diagram ini menunjukkan bahwa tanshinone I mungkin menghambat ekspresi mRNA target gen, termasuk PDGF-h, Ras, MAP2K3, CD44, Shb, phosphatidylinositol 3-kinase, Rac1, and IL-8.

## 2. Aktifitas anti inflamasi

Inflamasi terlibat pada proses patologi banyak penyakit yang berhubungan dengan produksi cytokines, seperti Interleukins, dan *tumor necrosis factor alpha*, seperti yang diungkapkan oleh Straub tahun 2007. Meningkatnya level cytokine tampaknya memiliki kontribusi meningkatkan insidensi penyakit inflamasi, penyakit neurodegenerative, menopause dan penyakit kardiovaskuler, seperti diungkapkan oleh Vural et al. tahun 2006.<sup>59</sup>

*Tanshinone* merupakan penghambat paling kuat pada produksi prostaglandin D<sub>2</sub>, *tanshinone* IIA menggunakan efek antiinflamasi melalui inhibisi ekspresi gen iNOS dan produksi NO, yaitu inhibisi cytokine inflamatori. Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa *tanshinone* dapat menghambat kemotaksis leukosit, karena itu mungkin memiliki efek terapeutik pada akut dan sub akut inflamasi, diungkapkan oleh Kang et al. tahun 2000 dan Yagi-Takeo tahun 2003. *In vitro* dan *in vivo* studi telah menunjukkan bahwa mekanisme *anti-inflammatory* dari *tanshinone* mungkin berhubungan terhadap produksi cytokine dan metabolisme asam arachidonat, diungkapkan oleh Kim et al. tahun 2002. Hasil penelitian tersebut dikonfirmasi oleh Wang tahun 2004 bahwa *tanshinone* IIA bertindak seperti phytoestrogen dan menggunakan efek anti-inflamasi dengan inhibisi produksi NO, IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha dan iNOS serta ekspresi mRNA, sehingga *tanshinone* IIA dapat digunakan sebagai obat anti-inflamasi pada masalah inflamasi selama masa menopause dengan batas fase awal infiltrasi makrofag. Hasil ini menjelaskan efektifitas kegunaan tradisional *S. miltiorrhiza* sebagai obat herbal anti-inflamasi.<sup>59</sup>

### 3. Aktifitas Antimikroba

Penelitian oleh Lee et al. tahun 1999 mendapatkan kesimpulan bahwa fraksi *S. miltiorrhiza* dan komponennya, yaitu Cryptotanshinone dan dihydrotanshinone-I menunjukkan aktifitas anti bakteri terhadap bakteri spektrum luas, baik spektrum luas bakteri gram positif dan gram negatif, dan radikal superoxide yang penting artinya dalam aksi bakteri terhadap agen. Pada penelitian Ji won et al. tahun 2007, ditemukan bahwa fraksi hexane dan chloroform dari *S. miltiorrhiza* terbukti memiliki efek aktifitas anti mikroba dan menghambat ekspresi gen resisten terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA (methicillinresistant *Staphylococcus aureus*).<sup>59</sup>

### 4. Aktifitas antivirus

Ekstrak larut air *S. Miltiorrhiza* menunjukkan potensial efek terhadap aktivitas integrasi HIV-1 *in vitro* dan replikasi virus *in vivo*. Pada tahun 2002, pada penelitian oleh Abd-Elazem et al., mendapatkan bahwa, komponen yang diisolasi dari *S. miltiorrhiza* merupakan inhibitor potensial terhadap anti-HIV. IC50 menghambat proses integrasi oleh HIV-1 ditemukan pada 0.83 microM untuk asam lithospermic dan 0.48 microM untuk asam lithospermic B, keduanya inhibitor yang menekan kuat infeksi akut HIV-1 dari sel H9 dengan nilai IC50 dari 2 dan 6.9 microM untuk asam lithospermic dan asam lithospermic B, sehingga disarankan dan diindikasikan bahwa kedua inhibitor integrasi selektif ini sebagai bagian dari obat terapi AIDS berdasarkan potensi tinggi dan efek sitotoksitasnya.<sup>59</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Wu et al. tahun 2007, menyatakan bahwa ekstrak *S. miltiorrhiza* (ethyl acetate extract and water extract) memiliki aktivitas antiviral dan juga potensi sebagai 71 agen anti-enterovirus. Enterovirus genus ssRNA virus berhubungan dengan beberapa penyakit pada manusia dan mammalia. Dalam sejarahnya, yang paling berarti adalah Poliovirus. Tipe lain adalah coxsackievirus dan echovirus. Enterovirus adalah yang paling umum menyebabkan *aseptic meningitis* dan dapat menyebabkan penyakit serius, terutama pada infant dan pada orang yang *immuno-compromised*. Enterovirus (family Picornaviridae) menginfeksi banyak orang diseluruh dunia tiap tahun, dalam skala besar dari hasil terapi klinis, dari infeksi yang tak tampak hingga *mild respiratory illness (common cold)*, penyakit tangan, kaki dan mulut, *acute hemorrhagic conjunctivitis*, *aseptic meningitis*, myocarditis, *severe neonatal sepsis-like disease*, dan *acute flaccid paralysis*.<sup>59</sup>

## **5. Aktifitas Anti-oksidan**

Dalam perkembangan ilmu biomedik, diketahui keterlibatan radikal bebas dalam banyak penyakit. Bukti-bukti tampak meningkat bahwa pada banyak penyakit degeneratif, seperti disfungsi otak, kanker, penyakit dan penurunan kekebalan tubuh dapat menjadi penyebab kerusakan sel dan anti oksidan memiliki peran penting dalam pencegahan penyakit, hal ini disebutkan dalam penelitian Aruoma et al. tahun 1998. Penelitian juga menunjukkan *phenolic compound*, yang berperanan sebagai antioxidant berguna dalam pencegahan berbagai macam penyakit dikatakan oleh Zainol et al. tahun 2003.<sup>59</sup>

Data terbaru, dari Lie et al. Tahun 2009, bahwa lebih dari 20 *phenolic acids* diisolasi dari *S. Miltiorrhiza*. Dalam dunia kesehatan, natural anti-oxidant telah secara luas diketahui seperti diungkapkan oleh Yen et al. tahun 2003, dimana penggunaan umum anti-oksidan yang berasal dari bahan kimia sintetis sudah dikurangi, diungkapkan oleh Ito et al. tahun 1985.<sup>59</sup>

Asam salvianolic A larut air dan asam salvianolic B telah diisolasi dan dimurnikan dari ekstrak kasar *S.miltiorrhiza*. Hasilnya menunjukkan bahwa asam salvianolic A dan asam salvianolic B menunjukkan aktifitas antioksidan yang tinggi. Di samping, fraksi larut air *S. miltiorrhiza* yang mengandung asam salvianolic B dan asam rosmarinic menunjukkan aktifitas *anti-lipoperoxidant* yang kuat melalui *scavenging superoxide anion radical*.<sup>59</sup>

## **6. Efek Kardiovaskuler**

Selama beberapa dekade, ekstrak *S. miltiorrhiza* telah secara luas digunakan dalam praktek klinis di China, Korea, Japan dan negara Asian lain sebagai obat dari berbagai masalah *microcirculatory disturbance-related diseases*, sebagai contoh : penyakit kardiovaskuler, *cerebrovascular disease*, dan pada beberapa penelitian ditujukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi aksi biologis dan mekanisme yang mendasarinya, seperti dikatakan oleh Feldman et al. tahun 2000. Penelitian oleh Chen et al. tahun 2001 juga melaporkan bahwa *S. miltiorrhiza* dapat merelaksasi arteri koronaria dimana miokardium mendapatkan antioksidan sehingga berefek menyelamatkan miokardium, mengurangi ketebalan tunika intima pada arteri carotid yang injuri, menghambat *platelet aggregation*, dan mencegah oksidasi LDL.<sup>59</sup>

*S. miltiorrhiza* menunjukkan efektifitasnya dalam mereduksi ukuran infark dan menurunkan angka kematian pada tikus dengan *acute myocardial infarction*. Efek antioxidant dan kemungkinan efek angiogenesis *S. miltiorrhiza* telah diketahui memainkan peran utama sebagai faktor proteksi terhadap *ischemic myocardium*.<sup>59</sup>

Salvianolic acids, merupakan komponen aktif utama dalam ekstrak larut air *S. miltiorrhiza*, menunjukkan efek potensial melindungi dan mencegah injuri miokardium dalam eksperimental klinis dan hewan. Kemudian dengan perkembangan teknologi terbaru biologi molekuler, dalam penelitian Yu-Chiang et al., tahun 2010, diungkapkan fungsi proteomik dari ekstrak larut air *S. miltiorrhiza* terhadap *vascular atherosclerotic lesions*.<sup>58</sup>

Secara singkat, menurut Ji W et al. tahun 2008, *S. miltiorrhiza* memiliki peranan yang tidak dapat disubstitusi dalam pencegahan dan treatment dari *cardiovascular related disease*. Seperti *myocardial protection*, *myocardial infarction* dan *acute myocardial infarction*, *coronary heart disease*, *congenital heart disease treatment*, pencegahan *ischemic heart disease* dan antianginal, *cardiac disease with contractile failure prevention*, *anti-atherosclerosis*, *arterial restenosis prevention*, *arterial intima prevention*, *chronic corpulmonale treatment*, *ventricular fibrillation prevention* dan *treatment*, efek hipertensi portal, *hypolipidemic activity* dan sebagainya.<sup>59</sup>

#### **2.4.4. Biomolekuler *Salvia miltiorrhizae* Bunge**

Hal pertama dan yang paling banyak dipelajari adalah NADH kuinon oksidoreduktase 1 (NQO1). NQO1, atau DT-diaphorase adalah kuinon flavin yang

mengandung reduktase dengan specificity 6 substrat yang luas. NQO1 mengkatalisis pengurangan berbagai kuinon melalui 2-elektron. Mekanisme pengurangan baik menggunakan NADH atau NADPH sebagai pengurang kofaktor, dan dihambat oleh kompetitif inhibitor dicoumarol. Penurunan dua-elektron mencegah pembentukan radikal bebas (semiquinones) dan spesies oksigen sangat reaktif (ROS), sehingga melindungi sel terhadap kuinon dan turunannya yang memiliki efek besar karsinogen, seperti telah disebutkan di atas.<sup>60,64</sup>

Pembentukan NQO1 dapat disebabkan oleh berbagai rangsangan termasuk fenolik antioksidan, pewarna azo, dan oksidatif stress. Induksi NQO1 dianggap sebagai pertahanan yang penting terhadap cancer. Selain peran detoksifikasi, NQO1 mengatur stabilitas p53 in vitro dan dalam sel-sel hidup. Sebagai contoh, karsinoma sel usus manusia yang over ekspresi NQO1 menumpuk pada tingkat yang lebih tinggi dari p53. Demikian, penurunan dari NQO1 mengurangi level p53 basal. Selanjutnya, NQO1 *null mice* menunjukkan tingkat protein p53 rendah dan penurunan apoptosis pada *bone marrow*. NQO1 mengikat p53 dalam NADH-dependent manner. Menariknya, dicoumarol dan kompetitif inhibitor NQO1 bersaing dengan NADH untuk mengikat NQO1, sehingga dalam disosiasi kompleks NQO1-p53. p53 menjadi sangat tidak stabil dan rentan terhadap proteasomal degradasi dalam kehadiran inhibitor. Proses degradasi p53 adalah oleh MDM2 independen. Selain itu, degradasi terjadi bahkan di bawah kondisi dimana jalur ubiquitination protein benar-benar dihambat.<sup>60,64</sup>

Temuan beberapa orang lain, seperti yang dijelaskan di bawah ini,

memperdebatkan jalur alternatif degradasi p53. Sel yang mengandung dicoumarol digunakan untuk menginduksi degradasi p53 secara default pada kerusakan DNA yang disebabkan apoptosis. Inhibitor lain dari NQO1, yang baru-baru ini diidentifikasi, adalah kurkumin. Bila sel T normal yang terkena kerusakan DNA di hadapan kurkumin, akumulasi p53 tidak diinduksi, dan T-sel apoptosis secara signifikan menurun.<sup>60,64</sup>