

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker kolon merupakan salah satu penyakit yang mematikan. Menurut *American Cancer Society* (2013) kanker kolon menempati urutan ketiga dengan angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 50.830 kematian penduduk di Amerika Serikat. Kejadian kanker kolon di Indonesia semakin meningkat dengan jumlah kasus 1,8 per 100.000 penduduk. Sebanyak 51% penderita kanker kolon berusia di bawah 50 tahun dari seluruh pasien dan sekitar 28% terjadi pada pasien dibawah usia 40 tahun. Sjamsuhidayat dan Jong (2006) menyatakan insidensi kanker kolon terus meningkat, perubahan perilaku hidup sehat penduduk Indonesia seperti tingginya asupan lemak dan protein, rendahnya asupan serat merupakan salah satu faktor terjadinya kanker kolon, adanya riwayat keluarga bukan menjadi salah satu faktor penyebab terjadinya kanker kolon, penderita kanker kolon di Indonesia lebih sering tanpa adanya pengaruh riwayat keluarga.

Doksorubisin merupakan agen kemoterapi golongan antrasiklin yang biasa digunakan secara luas untuk pengobatan kanker. (Siu dan Moore, 2005). Mekanisme kerja yang memperantarai doksorubisin dalam menghentikan pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan enzim topoisomerase II dengan menginduksi kerusakan DNA (Potter dkk., 2002). Penggunaan jangka panjang agen kemoterapi doksorubisin dapat menyebabkan efek samping diantaranya kardiotoxicitas dan kemoresisten, sehingga efektivitas penggunaan doksorubisin menjadi terbatas (Ferreirra dkk, 2008). Penggunaan doksorubisin dengan

mengurangi dosis pemberian dimungkinkan dapat mencegah terjadinya toksisitas dan efek samping yang ditimbulkan.

Salah satu upaya peningkatan efikasi doksorubisin yaitu melalui kombinasi agen kemoterapi doksorubisin dengan agen lain yang memiliki aktivitas sitotoksik. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kombinasi senyawa alam dengan agen kemoterapi doksorubisin mampu meningkatkan efek sitotoksik doksorubisin terhadap sel kanker, diantaranya penelitian Utami (2014) melaporkan bahwa kombinasi brazilein dengan doksorubisin dapat meningkatkan efek sitotoksik pada sel WiDr. Suparman (2008) melaporkan kombinasi ekstrak etanolik rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* L.) dengan agen sitotoksik doksorubisin mampu menginduksi apoptosis terhadap sel WiDr serta memberikan efek yang sinergis. Senyawa alami maupun sintesis dapat digunakan sebagai agen kokemoterapi (Tyagi dkk., 2004). Strategi terapi kanker dengan dilakukan kombinasi yang diberikan secara bersamaan merupakan upaya untuk meningkatkan efektivitas agen kemoterapi (Saunders, 2007)

Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) merupakan salah satu bahan alam yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen kokemoterapi. Penelitian Yun dkk (2003) membuktikan bahwa temu kunci yang merupakan salah satu *sepcies Kaemferia pandurata* mengandung senyawa Panduratin A yang berpotensi sebagai agen antikanker. Panduratin A mampu menghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan COX-2 yang merupakan faktor penting dalam perkembangan inflamasi dan sel tumor, sehingga kombinasi

Panduratin A dan agen kemoterapi dapat meningkatkan efektivitas terapi serta mengurangi efek toksik dan resistensi yang mungkin terjadi.

Sel WiDr yang dikembangkan pada medium kultur memiliki bentuk bulat dan menunjukkan peningkatan rasio nukleus terhadap sitoplasma yang ditandai dengan peningkatan ukuran inti, membesarnya nukleoli dan distribusi kromatin yang tidak teratur (Palozza dkk., 2005). Sel WiDr memiliki kelebihan yaitu mudah untuk dikulturkan dan memiliki *doubling time* yang singkat dibandingkan dengan kultur sel kanker lainnya, selain itu sel WiDr memiliki *plating efficiency* yang tinggi (Noguchi dkk, 1979)

Kombinasi ekstrak rimpang temu kunci dengan doksorubisin pada sel kanker WiDr belum pernah dilakukan. Rimpang temu kunci diharapkan menjadi agen kokemoterapi doksorubisin untuk meningkatkan aktivitas sitotoksik doksorubisin serta mampu menurunkan toksisitas dan resistensi yang ditimbulkan dari penggunaan doksorubisin terhadap penderita kanker kolon.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka perumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Apakah kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin pada sel kanker kolon mampu menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan nilai *Combination Index* (CI) yang diperoleh?
2. Berapakah konsentrasi kombinasi yang bisa menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis pada kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin terhadap sel kanker kolon WiDr?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Membuktikan sinergisme efek sitotoksik kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin pada sel kanker kolon WiDr dilihat dari nilai *Combination Index* (CI) yang diperoleh.
2. Menentukan konsentrasi kombinasi yang mampu menghasilkan efek sinergisme dari kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin pada sel kanker kolon WiDr.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu memberikan bukti adanya sinergisme efek sitotoksik kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin pada sel kanker kolon WiDr.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Kolon

Kanker kolon (usus besar) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh sel tubuh yang tumbuh tidak normal. Pada penderita kanker, akan terjadi perubahan ekspresi gen sehingga keseimbangan proliferasi dan kematian sel terganggu. Sel tersebut berkembang menjadi populasi sel yang mampu menyerang bagian tubuh yang lain, hingga dapat menimbulkan kematian inang (Ruddon, 2007). Kanker kolon menyerang manusia yang dimulai dari sel yang berbentuk kelenjar yang terdapat pada lapisan dalam usus besar yang kemudian menjalar ke bagian dinding kolon. Gejala kanker kolon meliputi nyeri perut, pendarahan rektum, perubahan kebiasaan pada pola buang air

besar, dan penurunan berat badan. Gejala lain berupa mual dan muntah, malaise, anoreksia, dan ditensi abdomen. Munculnya gejala bergantung pada lokasi kanker, ukuran kanker dan metastasis (Cappell, 2005).

Kanker kolon terjadi karena adanya peningkatan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2), yaitu enzim yang berperan dalam metabolisme arakidonat. Ekspresi COX-2 dapat terinduksi dengan cepat apabila ada reaksi inflamasi. Ekspresi COX-2 akan menginduksi pembentukan prostaglandin (PGE₂) dari asam arakidonat. Ekspresi COX-2 dan prostaglandin berhubungan dengan regulasi proliferasi sel, diferensiasi dan tumorigenesis (Turini dan Dubois, 2002). Prostaglandin akan mengaktifasi fosfatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) melalui jalur RAS/MAPK (Markowitz, 2007) dan pengaktifan proliferasi NF_κB. Aktivasi RAS/MAPK meningkatkan proliferasi sel, sedangkan aktivasi NF_κB akan menghambat apoptosis (Hanahan dan Weinberg, 2011)

Gen yang berpengaruh pada perkembangan kanker kolon adalah APC dan RAS. APC merupakan *tumor suppressor gene*. Jika ekspresi gen ini berhenti maka akan terjadi perkembangan polip pada kolon. RAS juga berpengaruh pada transisi awal dari epitel normal menjadi jaringan *pre-malignant*. Pada *pre-malignant colon polyps*, RAS akan termutasi. Fungsi normal dari RAS adalah mengaktifasi gen-gen daerah *downstream* transduksi sinyal yang bermuara pada cascade. Selanjutnya, pada sebagian besar kanker, terjadi mutasi *p53*, sehingga kerusakan DNA tidak dapat dikenali dan diperbaiki. Mutasi akan terus terjadi tanpa adanya koreksi sehingga

meningkatkan pertumbuhan sel kanker hingga terjadi metastasis (Yeatman, 2001).

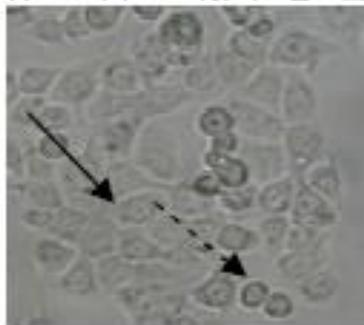
2. Sel WiDr

Sel WiDr merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr mengalami mutasi p53 pada posisi 257 yaitu terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin, namun adanya p21 yang masih normal memungkinkan terjadinya penghentian daur sel (Noguchi dkk, 1979). Perubahan tersebut dapat membuat afinitas p53 dalam mengikat protein apoptosis rendah sehingga efeknya tidak maksimum atau bahkan tidak berfungsi sebagai *tumor suppressor gene*. Apoptosis pada sel WiDr dapat terjadi melalui jalur independen p53, diantaranya melalui aktivasi p73 (Levrero dkk., 2000).

Karakteristik dari sel WiDr adalah adanya produksi antigen karsinoembrionik dan ekspresi COX-2 yang tinggi sehingga memacu proliferasi sel WiDr (Palozza dkk., 2005). Namun Bcl-2 sebagai protein antiapoptosis tidak diekspresikan tinggi. Sel WiDr memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan agen kemoterapi golongan antimetabolit seperti *5-fluorouracil* (5-FU) karena adanya peningkatan ekspresi enzim timidilat sintetase yang merupakan target penghantaman utama dari 5-FU (Jansen dkk., 1997). Pgp merupakan suatu protein yang berperan dalam pengeluaran obat dari sel, resistensi obat dapat terjadi karena adanya ekspresi yang berlebihan pada P-glikoprotein (Pgp). Penggunaan agen kemoterapi lain

seperti doksorubisin dapat dilakukan karena pgg pada sel WiDr tidak diekspresikan tinggi (Riganti dkk., 2005)

Sel WiDr (Gambar 1) yang dikembangbiakan dalam medium kultur terlihat berbentuk lebih bulat dibandingkan dengan sel normal serta menunjukkan peningkatan rasio nukleus terhadap sitoplasma yang ditandai dengan peningkatan ukuran inti, membesarnya nukleoli, dan distribusi kromatin yang tidak teratur. Beberapa kelebihan dari sel WiDr yaitu dapat membentuk tumor secara histologikal dengan efisiensi mendekati 100% pada empat *host* yang berbeda selama 1-4 tahun setelah inokulasi, mudah untuk dikulturkan, memiliki *doubling-time* yang cukup singkat yakni 15 jam, memiliki efisiensi *plating* yang tinggi yaitu 51% dan memiliki mekanisme resistensi terhadap agen kemoterapi yang cukup tinggi (Paloza dkk., 2005)

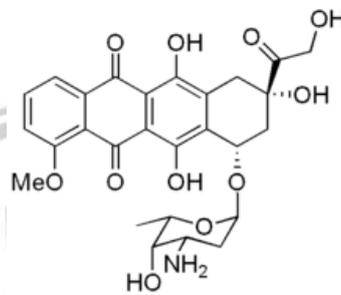


Gambar 1. Morfologi Sel Kanker Kolon WiDr. Sel WiDr dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumuran setelah diinkubasi pada suhu 37°C . (\longrightarrow) sel hidup, ($- - \rightarrow$) sel mati. (Handoko dkk., 2011)

3. Doksorubisin

Doksorubisin merupakan obat yang responsif terhadap berbagai macam kanker, salah satunya kanker kolon. Doksorubisin diisolasi dari fungi *Streptomyces peucetius var caesius* (Minotti dkk., 2004). Doksorubisin

merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang memiliki efek antitumor (Aschenbenner dkk., 2009). Doksorubisin memiliki cincin tetrasiklin yang berikatan dengan *daunorubicin* melalui ikatan glikosidik (Kwan, 2008). Doksorubisin adalah agen kemoterapi yang baik digunakan sebagai agen tunggal maupun kombinasi untuk mengobati berbagai macam kanker pada manusia. Struktur kimia doksorubisin pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia Doksorubisin (Chen dkk, 2006)

Rock dan DeMichele (2003) melaporkan bahwa mekanisme aksi doksorubisin kemungkinan melibatkan ikatan dengan DNA melalui interkalasi di antara pasangan basa serta menghambat sintesis DNA dan RNA melalui pengkacauan *template* dan halangan sterik. Kemungkinan mekanisme yang lain adalah melibatkan ikatan dengan lipid membran sel, yang akan mengubah berbagai fungsi selular dan berinteraksi dengan topoisomerase II membentuk kompleks pemotong DNA. Efek samping yang timbul segera setelah pengobatan dengan doksorubisin adalah mual, immunosupresi dan aritmia yang sifatnya reversibel serta dapat dikontrol dengan obat-obat lain. Efek samping yang paling serius akibat pengobatan dengan doksorubisin dalam jangka waktu yang lama adalah *cardiomyopathy* yang diikuti dengan gagal jantung (Bruton dkk, 2005)

Berdasarkan hasil penelitian restrospektif diketahui bahwa toksisitas kardiak akibat pemberian doksorubisin merupakan efek samping yang bergantung pada dosis. Mekanisme yang memperantarai toksisitas kardiak tersebut diduga disebabkan oleh terbentuknya spesies oksigen reaktif, meningkatnya kadar anion superoksida dan pengurasan ATP yang kemudian menyebabkan perlukaan jaringan kardiak (Wattanapitayakul dkk., 2005). Mekanisme kerja doksorubisin dengan mengikat DNA sel kanker, kemudian menghambat aktivitas enzim topoisomerase II dan membuat DNA menjadi kusut (Potter dkk., 2002). Drummond (2007) melaporkan bahwa mekanisme doksorubisin dalam menginduksi apoptosis dan menghambat siklus sel sebagian besar membutuhkan p53. Pada beberapa sel dengan p53 termutasi, doksorubisin relatif lebih resisten dibandingkan dengan sel kanker tanpa mutasi p53 (Di Leo dkk., 2007). Doksorubisin bertindak dengan menginterkalasi pasangan basa tertentu pada DNA sel kanker, sehingga terjadi bloking sintesis RNA atau DNA baru atau mencegah pemotongan DNA dan pada akhirnya, penggandaan DNA. Sel normal yang berproliferasi juga turut diserang oleh doksorubisin, sehingga terjadi efek samping seperti myelosupresi, alopeksia, atau mukositis (Aschenbenner dan Venable, 2009).

Doksorubisin juga dapat menimbulkan resistensi sel terhadap obat. Davis dkk. (2003) dan Notarbartolo dkk. (2005) menjelaskan mekanisme yang memperantarai resistensi tersebut antara lain melalui inaktivasi obat, pengeluaran obat oleh pompa pada membran sel, mutasi pada target obat, serta kegagalan inisiasi apoptosis. Penyebab lain yang berperan dalam

resistensi ini diduga melalui ekspresi berlebihan dari Pgp, yang merupakan suatu transporter membran plasma yang dapat mengantarkan agen kemoterapi keluar dari sel (Kitagawa, 2006).

4. Terapi Kombinasi

Terapi pengobatan kanker pada umumnya menggunakan terapi kombinasi (ko-kemoterapi) dengan agen-agen yang memiliki efek sinergis terhadap sel kanker, bersifat spesifik, dan memiliki efek toksik seminimum mungkin. Terapi kombinasi hingga saat ini dikembangkan secara empiris. Berbagai permasalahan seperti resistensi obat dan timbulnya toksisitas yang tinggi pada jaringan normal oleh beberapa agen kemoterapi, menjadi semakin sulit menemukan terapi kanker kolon yang efektif.

Pemanfaatan senyawa alam yang non-toksik dengan efektivitas tinggi melawan kanker dapat menjadi pilihan pengembangan terapi kombinasi dengan agen kemoterapi, berbagai metode dapat dilakukan untuk mengembangkan dan mengevaluasi kombinasi terapi yang tepat (Sharma dkk., 2004; Tyagi dkk., 2004).

Combination index (CI) merupakan metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat. Metode ini dikemukakan pertama kali oleh Chou dan Talalay pada tahun 1984 (Zhao dkk., 2004).

5. Tanaman Temu Kunci

Tanaman obat Indonesia telah lama digunakan secara tradisional dalam mengobati banyak penyakit. Salah satu tanaman berkhasiat golongan rempah-rempah yaitu temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) (Gambar 3). Temu kunci digunakan sebagai bahan untuk masak dan juga memiliki khasiat sebagai obat (Rukmana, 2008)



Gambar 3. Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*). (A) Tanaman temu kunci. (B) Rimpang temu kunci (Plantus, 2008)

a. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman temu kunci sebagai berikut (USDA, 2000) :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Boesenbergia</i>
Jenis	: <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlechter.

b. Deskripsi Tanaman

Tanaman temu kunci termasuk tanaman dengan ketinggian mencapai 13,5 cm. Daun tanaman berwarna hijau, helaian daun tegak, berbentuk lanset dengan ujung daun lancip, dan berukuran panjang 21,4 cm dan lebar 10,1 cm. Jumlah daun sekitar lima helai setiap pohon. Kelopak bunga berwarna ungu dengan ujung bagian atas berwarna merah. Bunga muncul dari pangkal daun, pada bagian atas berwarna ungu, sedangkan pada bagian bawah berwarna putih. Rimpang berbentuk bulat dikelilingi oleh anak-anak rimpang yang berbentuk agak memanjang dengan ujung gemuk. Kulit rimpang berwarna putih kotor, sedangkan daging berwarna kuning muda, kedalaman rimpang mencapai 4,5 cm dan panjang akar 19,8 cm. Ketebalan rimpang muda 0,76 cm dan ketebalan rimpang tua 1,73 cm. Jumlah rimpang muda setiap rumpun sekitar duabelas, sedangkan jumlah rimpang tua sekitar sembilan (Rukmana, 2008)

c. Kandungan Kimia Rimpang Temu Kunci

Rimpang temu kunci mengandung minyak atsiri berupa 1,8-sineol, kamfer, borneol, pinnen, seskuiterpen, zingiberon, curcumin dan zeodarin (Rukmana, 2008). Kandungan lainnya berupa kardamonin, pinosembrin, pinostrubin panduratin A dan 4-hidroksipanduratin (Trakoontivakorn dkk., 2001; Tuchinda dkk., 2002).

d. Khasiat Rimpang Temu Kunci

Rimpang temu kunci secara umum berkhasiat dalam mengobati penyakit rematik, radang lambung, peluruh air seni, malaria, sariawan,

diare, cacingan, perut kembung serta gangguan pada usus besar (Rukmana, 2008), selain sebagai analgetik temu kunci juga berkhasiat untuk mengobati indung telur (Muhlisah, 1999).

Negara berkembang lainnya tidak hanya memanfaatkan rimpang temu kunci sebagai bumbu masak, namun juga digunakan sebagai antibakteri, antitumor, antiinflamasi (Tewtrakul dkk, 2009; Tuchinda dkk, 2002). Penelitian lain oleh Sohn dkk., (2005) melaporkan bahwa rimpang temu kunci dapat digunakan sebagai obat kanker.

F. Landasan Teori

Handoko dkk (2011) melaporkan bahwa ekstrak etanolik rimpang temu kunci berpotensi sebagai agen kemopreventif sel kanker HeLa dan sel kanker kolon WiDr. Uji sitotoksik tunggal ekstrak etanolik rimpang temu kunci pada sel WiDr menghasilkan nilai IC_{50} yang rendah yaitu sebesar $76\mu\text{g/mL}$. Kandungan senyawa kalkon berpotensi sebagai agen kemopreventif sel kanker kolon WiDr. Penelitian Yun dkk (2006) melaporkan bahwa rimpang temu kunci mengandung senyawa panduratin A, dimana senyawa panduratin A merupakan derivat dari kalkon yang telah terbukti mampu menghambat proliferasi sel, menghambat terjadinya angiogenesis dan mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker kolon HT29 (Yun dkk., 2006). Sifat antiproliferatif panduratin A dalam menekan pertumbuhan sel kanker dengan mekanisme peningkatan ekspresi $p27^{Kip1}$ atau $p21^{WAF/Cip1}$ yang akan menurunkan level kompleks cyclin-CDK yang diperlukan selama daur sel. Senyawa aktif Panduratin A dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker kolon HT29 dengan dilakukan pengamatan insidensi

kondensasi kromatin, fragmentasi DNA, dan terbentuknya badan-badan apoptosis (Yun dkk., 2006). Mekanisme panduratin A dalam menghambat proses angiogenesis melalui penekanan ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) (Yun dkk., 2003).

Agen kemoterapi doksorubisin salah satu agen yang bekerja melalui penghambatan enzim topoisomerase II dengan menginduksi kerusakan DNA (Potter dkk., 2002), pada penggunaan agen kemoterapi dengan dosis yang tinggi dokorubisin dapat menimbulkan efek samping sehingga penggunaan agen kokemoterapi perlu digunakan pada terapi kanker. Agen kokemoterapi yang potensial biasanya menggunakan bahan alam. Berdasarkan mekanisme aksi yang berbeda dari masing-masing senyawa tersebut, diharapkan kombinasi doksorubisin dengan ekstrak etanolik rimpang temu kunci mampu meningkatkan efek sitotoksik dan meminimumkan kejadian efek samping agen kemoterapi doksorubisin.

G. Hipotesis

Berdasarkan uraian tersebut maka dapat dirumuskan hipotesis yaitu kombinasi ekstrak etanolik rimpang temu kunci dan doksorubisin mampu menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel kanker kolon WiDr.