

BAB I
PENDAHULUAN
A. Latar Belakang

Kanker serviks merupakan salah satu jenis kanker yang sering terjadi pada wanita di dunia dan paling mematikan serta menempati posisi pertama di negara miskin dan berkembang (WHO, 2013). Data yang dipublikasikan oleh Kementerian Kesehatan RI (KemenKes RI) menyatakan bahwa pada tahun 2013 jumlah penderita akibat kanker serviks di Indonesia mencapai 98,692 (KemenKes RI, 2015).

Modalitas terapi kanker adalah operasi, radiasi, kemoterapi dan imunoterapi. Kemoterapi menjadi pilihan utama pada pengobatan kanker. Cisplatin merupakan agen kemoterapi yang paling aktif terhadap pengobatan kanker serviks (Lyle, 2000). Mekanisme kerja cisplatin dengan membunuh sel dalam semua stadium siklus sel, mengikat DNA melalui pembentukan ikatan silang di dalam dan antar untaian, serta menghambat sintesis dan fungsi DNA (Katzung, 2007).

Cisplatin memiliki sejumlah efek samping antara lain nefrotoksisitas dan neurotoksisitas (Milosavljevic *et al.*, 2010), ototoxicity (gangguan pendengaran), gangguan elektrolit, dan mielotoksisitas (Windsor *et al.*, 2012). Selain itu, dilaporkan juga bahwa penggunaan agen kemoterapi sering menimbulkan multi drug resistance (MDR) yang menjadi permasalahan dalam penggunaan kemoterapi (Minami dkk., 2010). Mekanisme resistensi cisplatin terjadi melalui

perubahan pada *uptake* selular, efflux obat, penghambatan apoptosis dan peningkatan DNA *repair*, (Florea dan Busselberg, 2011).

Berbagai penelitian guna mengurangi resistensi obat terus dilakukan, sehingga dapat memperbaiki aplikasi klinik agen kemoterapi kanker serviks (Wong *et al.*, 2006). Salah satu upaya pendekatan yang dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan mengkombinasikan agen kemoterapi dengan agen kemopreventif. Senyawa yang ideal digunakan sebagai ko-kemoterapi bersumber dari bahan alami yang berefek sinergis dengan agen kemoterapi, sehingga dosis agen kemoterapi dapat diturunkan (Zhao *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011).

Salah satu bahan alam yang berpotensi dalam meningkatkan aktivitas agen kemoterapi adalah temu kunci (*Boesenbergia pandurata*). Salah satu kandungan utama yang berefek sitotoksik adalah Panduratin A (Sohn *et al.*, 2005). Senyawa panduratin A merupakan derivat kalkon yang menunjukkan aktivitas penurunan level protein *Cyclin D1* dan *Cyclin E*. Penggunaan panduratin A juga menurunkan regulasi CDK2, CDK4, dan CDK6. Penurunan kompleks cyclin-CDK dapat menghambat fosforilasi pRb sehingga E2F tidak aktif sebagai faktor transkripsi (Yun *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai kombinasi ekstrak tanaman dan cisplatin telah dilakukan sebelumnya yakni dengan minyak atsiri kayu manis (cinnamon) dapat meningkatkan efek sitotoksik cisplatin pada sel HeLa (Larasati *et al.*, 2014), ekstrak buah mahkota dewa dapat meningkatkan viabilitas sel Vero dan menurunkan efek nefrotoksik yang ditimbulkan oleh cisplatin (Zulharini *et al.*,

2013), dan ekstrak etanol herba leunca (*Solanum nigrum* L.) memberikan efek kombinasi yang sinergis pada sel HeLa (Istiaji *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut mengenai kombinasi agen kemoterapi dengan ekstrak berbagai bahan tumbuhan pada sel HeLa, maka peneliti hendak melihat aktivitas ko-kemoterapi EERTK dan cisplatin terhadap sel kanker serviks HeLa. Penelitian mengenai uji aktivitas ko-kemoterapi tersebut belum pernah dilaporkan sebelumnya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil sinergis dan lebih efektif dibandingkan ketika diberikan dalam bentuk agen tunggal.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ko-kemoterapi EERTK dan cisplatin mampu menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel kanker serviks HeLa berdasarkan nilai CI (*Combiation Index*) yang diperoleh?
2. Berapakah konsentrasi kombinasi yang bisa menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis pada kombinasi EERTK dan cisplatin terhadap sel kanker serviks HeLa ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Membuktikan sinergisme efek sitotoksik ko-kemoterapi EERTK dan cisplatin terhadap sel kanker serviks HeLa berdasarkan nilai CI (*Combiation Index*) yang diperoleh.

2. Menentukan konsentrasi kombinasi yang mampu menghasilkan efek sitotoksik sinergis pada kombinasi EERTK dan cisplatin terhadap sel kanker serviks HeLa.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yakni:

1. Memberikan informasi dasar tentang sinergisme kombinasi EERTK dan cisplatin untuk dapat dikembangkan pada penelitian selanjutnya.
2. Menambah informasi ilmiah tentang hasil penelitian sinergisme kombinasi EERTK dan cisplatin untuk pengobatan kanker serviks.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Serviks dan Sel kanker servik HeLa

Kanker serviks (Kanker leher rahim) adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim/serviks (bagian terendah dari rahim yang menempel pada puncak vagina). Kanker serviks biasanya menyerang wanita berusia 35-55 tahun. (Indrawati, 2009).

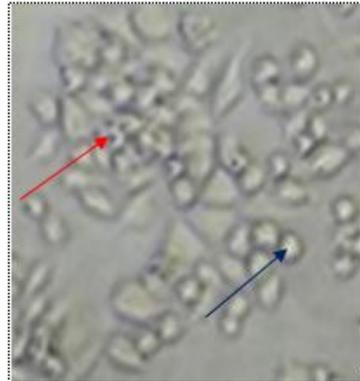
Penyebab utama kanker serviks adalah virus HPV (Human Papilloma Virus). Lebih dari 90% kanker serviks jenis skuamosa mengandung DNA virus HPV dan 50% kanker serviks berhubungan dengan HPV tipe 16. Penyebaran virus ini terutama melalui hubungan seksual (Prawirohardjo, 2010).

Kultur sel HeLa atau HeLa *cell line* merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (servix) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951 (Doyle dan Griffith, 2000). Kultur sel ini memiliki

sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler (Goodwin dan Di Maio, 2000).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transpor, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1996).

Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papilloma Virus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan Di Maio, 2000). Morfologi sel HeLa dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Morfologi sel HeLa. Sel HeLa dengan kepadatan $1 \times 10^4/100\mu\text{l}$ di inkubasi pada suhu 37° dengan perbesaran 100x. Sel hidup (—→), Sel mati (—→), (Dokumen pribadi).

2. Cisplatin

Cisplatin adalah suatu kompleks logam anorganik cis-diamin diklor platinum (II) yang ditemukan oleh Dr. Roesenberg pada tahun 1865 (Rosenberg *et al.*, 1965) yang merupakan agen kemoterapi anggota pertama dari kelas obat antikanker yang mengandung platinum. Cisplatin memiliki aktivitas antitumor pada sejumlah besar tumor solid, termasuk kanker esofagus dan lambung, kanker kepala dan leher, atau kanker genitourinaria khususnya kanker, ovarium, kandung kemih (Katzung *et al.*, 2007). Pada penelitian *in vivo*, kompleks platinum akan mengikat dan menyebabkan *crosslinking* DNA, yang akhirnya dapat memicu apoptosis (kematian sel terprogram) (Dhar *et al.*, 2011).

Cisplatin mampu melepaskan sitokrom c dengan mengaktifasi caspase 8 sehingga menginduksi apoptosis. Kombinasi cisplatin dengan Bcl-2 *antisense* dilaporkan memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi daripada perlakuan tunggalnya dengan melihat parameter viabilitas sel, apoptosis dan pelepasan sitokrom c pada sel p53(+) MCF-7 dan p53(-) MCF-7 (Basma *et al.*, 2005).

Cisplatin memiliki sejumlah efek samping yang dapat membatasi penggunaannya. Efek samping tersebut antara lain nefrotoksisitas dan neurotoksisitas (Milosavljevic *et al.*, 2010), ototoxicity (gangguan pendengaran), gangguan elektrolit, dan mielotoksisitas (Windsor *et al.*, 2012). Efek samping tersebut dapat menyebabkan keterbatasan dosis yang diberikan (Loehrer dan Einhorn, 1984).

Mekanisme antikanker cisplatin juga didukung kemampuannya berikatan dengan DNA mitokondria, yang menyebabkan ketidakmampuan mitokondria melakukan perbaikan nukleotida DNA-*adduct* pada nukleus. DNA-*adduct* yang diakibatkan karena penggunaan cisplatin mempengaruhi replikasi dan transkripsi DNA sehingga dapat menyebabkan berhentinya siklus sel dan memicu apoptosis pada sel kanker. Progresi siklus sel melalui fase S sehingga terjadi sintesis DNA dan berhenti pada fase G2 merupakan modulasi siklus sel karena penggunaan cisplatin. Penggunaan dosis rendah cisplatin akan memicu berhentinya di fase G2, sedangkan penggunaan pada dosis tinggi menyebabkan kematian sel (Jamieson dan Lippard, 1999).

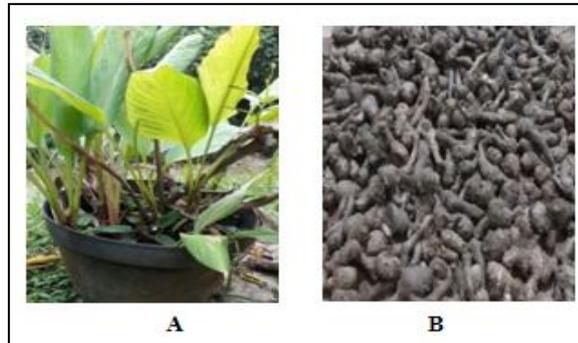
Penghambatan oleh cisplatin pada sel kanker juga terjadi dengan adanya pemendekan dan degradasi telomer melalui penghambatan aktivitas telomerase (Jamieson dan Lippard, 1999). Selain mampu berikatan dengan DNA, cisplatin dapat mengikat senyawa biomolekul seperti enzim, reseptor maupun protein dan menyebabkan perubahan aktivitas dari senyawa biomolekul tersebut. Ikatan tersebut terjadi melalui ikatan koordinasi pada

atom sulfur dari residu sistein dan atau metionin serta pada atom nitrogen pada residu histidin (Cepeda *et al.*, 2007).

Resistensi cisplatin dapat melalui berbagai macam mekanisme, seperti reduksi atau penurunan jumlah akumulasi cisplatin dalam sel. Cisplatin diketahui dapat memasuki sel melalui CTR1 (*Copper Transporter*), sehingga mutasi ataupun delesi gen CTR1 dapat menyebabkan reduksi jumlah cisplatin intra seluler target dan selanjutnya dapat menyebabkan resistensi. Proses *efflux* pada cisplatin diperantarai oleh Copper-transporting P-type Adenosine Triphosphate (ATP7B), sehingga protein ini juga memiliki peran terhadap resistensi pada pemberian cisplatin (Holzer *et al.*, 2006). Protein eksporter lain yang diketahui memiliki pengaruh pada resistensi cisplatin melalui proses *efflux* adalah ATP-Binding cassette, sub family C2 (ABCC2). Selain itu, terdapat mekanisme metabolisme melalui konjugasi cisplatin pada gugus tiol glutation (GSH) di sitoplasma yang menyebabkan deaktivasi cisplatin sehingga mampu terjadinya resistensi (Cepeda *et al.*, 2007).

3. Tanaman Temu Kunci

Temu kunci merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak ditemukan di negara-negara Asia beriklim tropis. Di Indonesia, temu kunci berasal dari Pulau Jawa atau tepatnya daerah Jawa Tengah dan Jawa Timur. Tanaman ini tumbuh di daerah yang lembab atau di bawah perlindungan pohon-pohon besar (Kardono *et al.*, 2003). Tanaman temu kunci dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2. Temu kunci (*Boesenbergia Pandurata*). A. Tanaman temu kunci.
B. Rimpang temu kunci. (Dokumen pribadi).**

a. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman temu kunci adalah sebagai berikut :

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Boesenbergia*

Spesies : *Boesenbergia pandurata* (Kardono *et al.*, 2003)

b. Morfologi

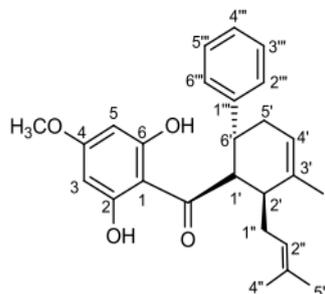
Temu kunci berperawakan herba rendah, merayap di dalam tanah. Dalam satu tahun pertumbuhannya 0,3-0,9 cm. Batangnya merupakan batang asli di dalam tanah sebagai rimpang, berwarna kuning coklat, aromatik, menebal, berukuran 5-30 x 0,5-2 cm. Batang di atas tanah berupa batang semu (pelepah daun). Daunnya berjumlah 2-7 helai, daun bawah berupa pelepah daun berwarna merah tanpa helaian daun. Tangkai daun beralur, panjangnya 7-16 cm, lidah-lidah berbentuk segitiga melebar, menyerupai selaput, panjang 1-1,5 cm, pelepah daun sering sama panjang dengan tangkai

daun; helai daunnya tegak, bentuk lanset lebar atau agak jorong, ujung daun runcing, permukaan halus tetapi bagian bawah agak berambut terutama sepanjang pertulangan, warna helai daun hijau muda, lebarnya 5-11 cm.

Bunga tanaman ini berupa susunan bulir tidak terbatas, di ketiak daun, dilindungi oleh 2 spatha, panjang tangkai 41 cm, umumnya tangkai tersembunyi dalam 2 helai daun terujung. Kelopak bunganya 3 buah lepas, runcing. Mahkota bunganya 3 buah, warnanya merah muda atau kuning-putih, berbentuk tabung 50-52 mm, bagian atas tajuk berbelah-belah, berbentuk lanset dengan lebar 4 mm dan panjang 18 mm. Benang sarinya 1 fertil besar, kepala sarinya bentuk garis membuka secara memanjang. Lainnya berupa bibir-bibir (staminodia) bulat telur terbalik tumpul, merah muda atau kuning lemon, gundul, 6 pertulangan, dan ukurannya 25×7 cm. Putik bunganya berupa bakal buah 3 ruang, banyak biji dalam setiap ruang (Plantus, 2008).

c. Kandungan kimia

Rimpang temu kunci mengandung panduratin A yang merupakan senyawa fenolik (Sohn *et al.*, 2005; Kirana *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2006), kalkon, pinosembrin, pinostrobin, 4-hidroksipanduratin (Trakoontivakorn *et al.*, 2001). Panduratin A (gambar 3) merupakan derivat kalkon yang mempunyai efek biologis, seperti antiinflamasi, analgetik, antikanker dan antioksidan (Yun *et al.*, 2006 dan Geonadi *et al.*, 2009).



Gambar 3. Struktur Kimia Panduratin A. (Marliyana *et al*, 2017)

d. Khasiat

Secara umum, masyarakat menggunakan rimpang temu kunci sebagai peluruh dahak atau untuk menanggulangi batuk, peluruh kentut, penambah nafsu makan, menyembuhkan sariawan, bumbu masak, dan pemacu keluarnya Air Susu Ibu (ASI). Minyak atsiri rimpang temu kunci juga berefek pada pertumbuhan *Entamoeba coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*; selain itu dapat berefek pada pelarutan batu ginjal kalsium secara *in vitro*. Perasan dan infusa rimpang temu kunci memiliki daya analgetik dan antipiretik. Di samping itu dapat mempunyai efek abortivum, resorpsi dan berpengaruh pada berat janin tikus. Ekstrak rimpang yang larut dalam etanol dan aseton berefek sebagai antioksidan pada percobaan dengan minyak ikan sehingga mampu menghambat proses ketengikan. Dari penelitian lain diperoleh informasi bahwa ekstrak rimpang temu kunci dapat menghambat bakteri isolat penyakit Orf (*Ektima contagiosa*) (Plantus, 2008).

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. Namun demikian, sampai saat ini belum ada terapi pengobatan untuk kanker serviks yang telah metastasis. Selain itu, berbagai permasalahan seperti resistensi obat dan timbulnya toksisitas yang tinggi pada jaringan normal oleh beberapa agen kemoterapi, menjadi semakin sulit menemukan terapi kanker serviks yang efektif. Hal tersebut menuntut pengembangan cara pengobatan baru bagi kanker serviks (Tyagi *et al.*, 2004).

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 *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 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 *et al.*, 2004). Analisis CI menghasilkan suatu nilai parameter kuantitatif yang menggambarkan efikasi dari suatu kombinasi.

A. Landasan Teori

Temu kunci merupakan tanaman yang berkhasiat sebagai anti kanker. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa ekstrak etanolik temu kunci berpotensi sebagai agen kemopreventif sel kanker HeLa dengan IC_{50} 87 $\mu\text{g/ml}$ dan sel kanker kolon WiDr dengan IC_{50} 76 $\mu\text{g/ml}$ (Handoko *et al.*, 2011), sel kanker kolon (HT-29) dengan IC_{50} 6,56 $\mu\text{g/ml}$ dan sel kanker payudara (MCF-7) dengan IC_{50} 3,75

$\mu\text{g/ml}$ (Kirana *et al.*, 2006), sel kanker paru (A569) dengan IC_{50} 4,4 $\mu\text{g/ml}$ (Cheah *et al.*, 2011).

Rimpang temu kunci diketahui memiliki kandungan senyawa aktif panduratin A. (Trakoontivakorn *et al.*, 2001). Sohn *et al.*, (2005) menyatakan bahwa panduratin A menghambat kuat pertumbuhan sel kanker HepG2 yang diinduksi dengan tert-Butylhydroperoxide (t-BHP). Panduratin A juga dapat memacu apoptosis sel melalui aktivasi caspase. Induksi apoptosis dan atau penghambatan pembelahan sel berhubungan erat dengan aktivasi intraselular *signaling pathway* untuk menghentikan siklus sel pada fase G1, S, atau G2/M. Perlakuan dengan panduratin A pada sel CaP, menunjukkan penurunan level protein cyclin B1, cdc25C and cdc2, (Yun *et al.*, 2006) dan efek dari penghambatan aktivitas cyclin B1-cdc2 oleh panduratin A mengakibatkan terhentinya transisi fase G2/M. Dengan penghambatan aktivitas siklus sel pada berbagai fase, maka panduratin A memiliki sifat antiproliferatif yang dapat menekan pertumbuhan sel kanker (Lodish *et al.*, 2000).

Cisplatin diketahui merupakan agen kemoterapi yang paling aktif terhadap kanker serviks (Lyle, 2000). Cisplatin bekerja dengan membunuh sel pada semua tahap siklus pertumbuhannya, menghambat biosintesis DNA, dan mengikat DNA melalui pembentukan ikatan silang (*cross-link*) (Dipiro *et al.*, 2002). Menurut penelitian Mokhtari *et al* (2012). Cisplatin mampu melepaskan sitokrom c dengan mengaktifasi caspase 8 sehingga menginduksi apoptosis. Kombinasi cisplatin dengan Bcl-2 *antisense* dilaporkan memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi daripada perlakuan tunggalnya dengan melihat parameter viabilitas sel, apoptosis

dan pelepasan sitokrom c pada sel p53(+) MCF-7 dan p53(-) MCF-7 (Basma *et al.*, 2005).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa kombinasi senyawa alam dengan cisplatin menghasilkan efek sitotoksik sinergis yakni dengan minyak atsiri kayu manis (cinnamon) dan cisplatin dapat meningkatkan efek sitotoksik pada sel HeLa (Larasati *et al.*, 2014), ekstrak buah mahkota dewa dapat meningkatkan viabilitas sel Vero dan menurunkan efek nefrotoksik yang ditimbulkan oleh cisplatin (Zulharini *et al.*, 2013), dan ekstrak etanol herba leunca (*Solanum nigrum* L.) memberikan efek kombinasi yang sinergis pada sel HeLa (Istiaji *et al.*, 2010).

Berdasarkan kemampuan senyawa panduratin A yang terdapat dalam rimpang temu kunci dan perbedaan jalur mekanismenya dengan agen kemoterapi seperti cisplatin diharapkan dapat memberikan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel kanker serviks HeLa.

B. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori di atas, dapat ditarik hipotesis bahwa ko-kemoterapi EERTK dan cisplatin mampu menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel kanker serviks HeLa.