

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita wanita dan meningkat setiap tahunnya (Jemal *et al.*,2010). Jumlah kejadian kanker payudara di seluruh dunia hingga tahun 2012 sebanyak 1,7 juta dan 24% dari semua kejadian kanker payudara terjadi di wilayah Asia-Pasifik. Indonesia menempati posisi ketiga setelah China dan Jepang dengan angka kematian terbesar karena kanker payudara (Youlden *et al.*,2014). Kejadian kanker payudara di Indonesia menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks pada wanita (Tjindarbuni *and* Mangunkusumo, 2002).

Penanganan kanker payudara dilakukan melalui operasi, kemoterapi, terapi hormon dan terapi radiasi (Walsh *and* O'Higgins,2000). Penggunaan agen kemoterapi masih menjadi prioritas utama dalam pengobatan kanker payudara. Kemoterapi dilakukan untuk membunuh sel kanker dengan obat anti kanker, namun frekuensi pemberian kemoterapi dapat menimbulkan beberapa efek yang dapat memperburuk kondisi pasien. Efek kemoterapi yaitu supresi sumsum tulang, gejala gastrointestinal seperti mual, muntah, kehilangan berat badan, kehilangan rasa, konstipasi, diare, dan gejala lainnya alopesia, *fatigue*, perubahan emosi, dan perubahan pada syaraf (Setiawan, 2015). Terapi kanker dengan tanaman herbal menjadi salah satu pendekatan yang dikembangkan untuk mengatasi efek samping dan dapat dikembangkan sebagai kemoprevensi (Sudjadi

dan Laila, 2006). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai agen kemopreventif adalah bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.).

Bayam merah mengandung pigmen merah menandakan kandungan flavonoid-nya cukup tinggi (Rumimper dkk, 2014). Flavonoid dapat memacu apoptosis melalui beberapa mekanisme diantaranya penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi signalling pathways, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak (Taraphdar, 2001). Penelitian Jayaprakasam *et al.*, (2004) menyatakan bayam merah memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF7.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti ingin melakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak air bayam merah terhadap induksi apoptosis dengan menggunakan sel yang memiliki karakteristik berbeda yaitu sel T47D yang belum pernah dilakukan sebelumnya. Sel T47D *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma *et al.*, 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat diambil perumusan masalah :

1. Apakah ekstrak air bayam merah memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D?
2. Apakah ekstrak air bayam merah mampu menginduksi apoptosis sel kanker T47D ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Membuktikan ekstrak air bayam merah memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.
2. Membuktikan ekstrak air bayam merah dalam menginduksi apoptosis sel kanker T47D.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan :

1. Informasi ilmiah mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak air bayam merah terhadap induksi apoptosis sel T47D.
2. Menambah khasanah aktivitas farmakologi dari herbal bayam merah sehingga dapat dikembangkan dan didayagunakan sebaga salah satu obat tradisional.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah pertumbuhan sel payudara yang tidak terkontrol lantaran perubahan abnormal dari gen yang bertanggung jawab atas pengaturan pertumbuhan sel. Secara normal, sel payudara akan mati, lalu digantikan oleh sel baru yang lebih ampuh. Regenerasi sel seperti ini berguna untuk mempertahankan fungsi payudara. Pada kasus kanker payudara, gen yang bertanggung jawab terhadap pengaturan pertumbuhan sel termutasi. Kondisi itulah yang disebut kanker payudara. Jenis yang paling umum dari kanker payudara adalah *lobular carcinoma in situ* (LCIS), *Ductal Carcinoma in situ* (DCIS), *Infiltrating Lobular Carcinoma* (ILC) *Infiltrating Ductal Carcinoma* (IDC) (Supriyanto,2015). Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara yang berasal dari kelenjar, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara. Kanker payudara terjadi karena adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sehingga sel ini tumbuh dan berkembang biak tanpa dapat dikendalikan (Mardiana,2004).

Faktor resiko kanker dibagi menjadi tiga bagian yaitu faktor resiko perilaku, faktor resiko hormonal, dan faktor resiko yang diwariskan. Faktor resiko perilaku antarlain merokok, makanan yang mengandung lemak serta daging yang diawetkan. Faktor resiko hormonal adalah estrogen. Estrogen dapat berfungsi sebagai promotor bagi kanker payudara dan endometrium. Adanya riwayat keluarga yang mengidap kanker terutama kanker dari satu jenis adalah faktor resiko terjangkitnya kanker (Corwin,2000).

Pengobatan kanker dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi (Apantaku, 2002). Pembedahan adalah pilihan utama pada terapi kanker payudara. Pembedahan biasa dilakukan pada penyakit kanker stadium awal yang bertujuan untuk menghilangkan sel-sel kanker dengan menghilangkan bagian yang terkena kanker dan jaringan di sekitarnya. Pembedahan dan radioterapi dapat mengontrol tumor lokal pada sebagian besar pasien, meskipun lebih dari 60% akan meninggal jika jaringan tumornya menyebar (Rom *et al.*, 2008). Efek yang ditimbulkan dari pembedahan adalah adanya sisa-sisa sel kanker yang tidak bersih setelah operasi dapat muncul kembali. Pengobatan dengan radiasi menggunakan sinar berenergi tinggi untuk membunuh sel-sel kanker dapat menimbulkan efek samping seperti mual, muntah, diare, iritasi, dan bahkan dapat meningkatkan risiko munculnya kanker seperti kanker uterus, ginjal, dan kandung kemih (NCI, 2012).

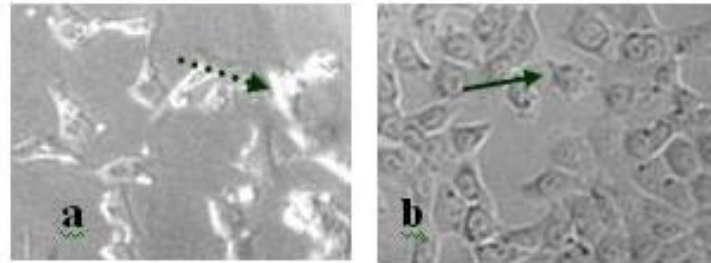
Pengobatan kanker payudara stadium dini adalah multidisiplin, yang modalitasnya terdiri dari operasi, dikenal berbagai jenis operasi kanker payudara mulai dari radikal mastektomi, supra radikal mastektomi, modified radikal mastektomi, simple mastektomi, *breast conserving treatment*, *sentinel node biopsy*. Terapi adjuvant adalah terapi yang diberikan setelah terapi primer, dan neoadjuvant yaitu terapi yang diberikan mendahului terapi primer atau terapi utama. Pengobatan kanker payudara lanjut dengan metastase ini survival hanya lebih kurang 2 tahun setelah diagnosis. Pada stadium ini penyakit sudah menyebar luas, terapi utama adalah sistemik, kemoterapi, atau hormonal terapi (Ramli, 2015).

2. Sel Kanker Payudara T47D

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5% dan suhu 37⁰C (Abcam, 2007).

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missence mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer *et al.*, 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma *et al.*, 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitive terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

Morfologi sel T47D dapat dilihat pada gambar 1.



Keterangan

→ sel hidup

.....→ sel yang telah berubah morfologi

Gambar 1. Morfologi sel T47D (CCRC, 2010)

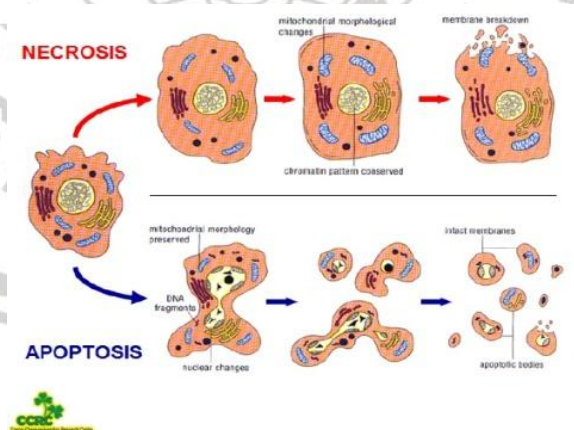
3. Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang menghasilkan perubahan karakteristik morfologi dan biokimia sel. Stimulasi proses apoptosis meliputi kerusakan DNA, adanya TNF (*Tumor Necrosis Factor*) atau tidak adanya faktor pertumbuhan. Apoptosis ditandai dengan adanya membrane blebbing tanpa hilangnya integritas membran, kondensasi dan fragmentasi kromatin, pepadatan organela sitoplasma, dilatasi dari retikulum endoplasma, penurunan volume sel dan pembentukan badan apoptosis (CCRC,2009).

Setiap sel mengandung mekanisme yang mana terdapat sinyal kematian atau bertahan hidup, apoptosis dihasilkan dari ketidak seimbangan antara kedua sinyal tersebut. Apoptosis yang terlalu banyak atau terlalu sedikit dapat menyebabkan berbagai macam penyakit, seperti penyakit degenerasi dan kanker.

Mekanisme dasar apoptosis, gen dan protein yang mengendalikan proses serta jalur apoptosis terdapat dalam semua organisme multiseluler (Mahmoud, 2005; Kumar *et al.*, 2010).

Berdasarkan perbedaan morfologi dan biokimiawi, kematian sel ada dua macam yaitu apoptosis dan nekrosis (Edinger, 2004). Nekrosis terjadi bila sel terkena hipotermia dan hipoksia, atau oleh senyawa-senyawa kimia dan mikroorganisme yang menyebabkan kerusakan membran sel sehingga terjadi kegagalan homeostasis. Selanjutnya diikuti dengan masuknya air dan ion-ion di sekitar sel yang menyebabkan pembengkakan sel, rusaknya organel, dan pecahnya membran sel, sehingga seluruh kandungan sel keluar ke cairan ekstraseluler. Kerusakan jaringan yang meluas pada nekrosis ini menyebabkan inflamasi (Guimaraes and Linden, 2004). Perbedaan apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada gambar 2:



Gambar 2 : Perbedaan mekanisme sel apoptosis dan nekrosis (Kumar; Cotran & Robbins, 2010)

Mekanisme apoptosis melalui jalur ekstrinsik (kematian reseptor) dan intrinsik (mitokondria) (Mossalam, 2012). p53 berfungsi sebagai pengatur proses apoptosis yang dapat memodulasi titik kontrol kunci pada jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur intrinsik diaktifkan sebagai respon dari sinyal yang dihasilkan dari kerusakan DNA, hilangnya faktor sel hidup, stress yang parah atau jenis lain. Protein pro-apoptosis dilepaskan dari mitokondria untuk mengaktifkan protease caspase sehingga memacu apoptosis (Lessene *et al.*, 2008). Jalur intrinsik merupakan hasil dari peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis seperti sitokrom c kedalam sitoplasma. Ketika sinyal pro-apoptosis tidak dilepaskan, maka sel tidak akan mati. Jalur intrinsik tergantung dari keseimbangan aktivitas antara sinyal pro dan anti-apoptosis dari keluarga Bcl-2. Keluarga Bcl-2 mengatur permeabilitas membran mitokondria dan menentukan pelepasan sinyal pro- atau anti apoptosis dalam sel (Vogler *et al.*, 2009).

Alur ekstrinsik diawali melalui keterlibatan reseptor kematian membran plasma pada berbagai sel (Kumar, *et al.*, 2010). Reseptor kematian merupakan anggota dari keluarga reseptor TNF yang mengandung domain sitoplasma yang ikut dalam interaksi protein, disebut domain kematian karena pentingnya untuk mengantarkan sinyal apoptosis (beberapa anggota keluarga reseptor TNF tidak mengandung domain kematian, fungsi mereka untuk mengaktifasi alur inflamasi, dan perannya dalam mencetuskan apoptosis sangat sedikit). Reseptor kematian yang paling banyak diketahui adalah reseptor TNF tipe 1 (TNFR1) dan protein yang terkait yang dinamakan Fas (CD95). Mekanisme apoptosis yang di induksi

oleh reseptor kematian digambarkan dengan baik pada Fas. Reseptor kematian diekspresikan pada berbagai tipe sel. Ikatan terhadap Fas dinamakan Fas ligand (FasL). FasL di ekspresikan pada sel T untuk mengenali self antigen (berfungsi untuk mengeliminasi self-reactive limfosit), dan pada beberapa limfosit T sitotoksik (yang membunuh sel yang terinfeksi virus atau tumor). Ketika FasL mengikat Fas, tiga atau lebih molekul dari Fas dibawa bersama – sama dengan domain kematian sitoplasma yang kemudian membentuk tempat pengikatan untuk protein yang juga mengandung domain kematian dan dinamakan FADD (Fas-associated death domain). FADD yang melekat pada reseptor kematian kemudian berubah bentuk menjadi caspase-8 inaktif (pada manusia, caspase-10), juga melalui domain kematian. Molekul pro-caspase-8 multipel dibawa ke dalam jarak tertentu sehingga mereka bersatu membentuk caspase-8 aktif. Enzim kemudian mencetuskan aktivasi caspase dengan memecah dan dengan demikian mengaktifkan procaspase yang lain, dan enzim yang aktif memediasi fase eksekusi apoptosis. Alur apoptosis ini dapat dihambat oleh protein yang dinamakan FLIP, yang dapat mengikat pro-caspase-8 tetapi tidak dapat membelah dan tidak menjadi aktif (Lumongga,2008).

4. Bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Bayam merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Asia, khususnya Asia Selatan dan Asia Tenggara (Grubben dan Denton, 2006). Bayam tersebar luas di pulau Jawa dan pulau Maluku. Bayam *Amaranthus tricolor* L. dikenal dengan nama yang berbeda-beda di setiap daerah seperti bayam glatik, bayam putih, bayam merah (Jakarta), bayam abrit, bayam sekul, bayam siti (Jawa), jawa

lufife, tona ma gaahu, baya roriha, loda kohori (Maluku). Nama lain dari tanaman ini adalah *Amaranthus gangeticus* dan *Amaranthus tristis*. Terdapat tiga varietas bayam yang termasuk *Amaranthus tricolor* L. yaitu bayam hijau biasa, bayam merah (*Blitum rubrum*) yang memiliki batang dan daun berwarna merah, serta bayam putih (*Blitum album*) yang berwarna hijau keputih-putihan. Bayam ini dijual di pasaran dikenal sebagai bayam cabutan atau bayam sekul (Dalimartha, 2005).

a. Sistematika Tanaman

Amaranthus tricolor L. disebut juga bayam cabut karena umurnya hanya 30 hari, langsung dicabut seluruh bagian tanamannya termasuk akar. Bayam ini termasuk tanamanyang tumbuh menahun berbentuk terna dengan tinggi mencapai 1.5 meter. Tanaman bayam terdiri dari akar, batang, daun, bunga, dan biji. Sistem pengakarannya menyebar dangkal dengan kedalaman 20 – 40 cm dan memiliki akar tunggang. Bayam termasuk kelas Dicotyledone (tanaman berbiji keeping dua). Batangnya banyak mengandungair (herbaceous), tumbuh di atas permukaan tanah dan memiliki batang bercabang banyak. Daun bayam berbentuk bulat telur dengan ujungnya agak meruncing danurat-urat daun terlihat jelas. Warna daun bervariasi, ada yang hija biasa, hijau keputih-putihan sampai warna merah. Bunga tersusun dalam malai (untaian bunga) yang tumbuh tegak keluar dari ujung tanaman ataupun dari ketiak-ketiak daun. Bentuk malai memanjang mirip ekor kucing. Perbanyakkan tanaman umumnya melalui biji. Dari setiap malai dapat menghasilkanratusan hingga ribuan biji. Ukuran biji sangat kecil, bentuknya bulat,

dan berwarna coklattu mengkilap sampai hitam kelam(Rukmana,1994).

Morfologi bayam merah dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Morfologi bayam merah (Astawan *et al.*,2013)

Dalam taksonomi, bayam ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Superdivisi: Spermatophyta

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Subkelas: Hamamelidae

OrdoFamili: Amaranthaceae

Genus: Amaranthus

Subgenus: Albersia

Spesies: *Amaranthus tricolor* L.(Saparinto, 2013).

b. Kandungan Kimia

Kandungan senyawa kimia bayam merah adalah flavonoid, betalain, vitamin C, dan vitamin A, mineral, riboflavin, dan asam folat (Wiyasihati, 2016). Adapun bayam merah mengandung pigmen merah menandakan kandungan flavonoid-nya cukup tinggi (Rumimper dkk, 2014). Jenis flavonoid yang terdapat pada bayam merah adalah kuersetin dan rutin (Noori *et al.*, 2015).

c. Khasiat

Bayam merah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit seperti batuk, infeksi tenggorokan, sakit gigi, diare, gonore, keputihan, dan impotensi (Aneja *et al.*, 2011). Bayam merah dapat digunakan sebagai antioksidan, hepatoprotektor, dan gangguan hati (Al-Dosari, 2010). Manfaat bayam merah adalah memperlancar system pencernaan, anti kanker, mengurangi kolestrol, dan antidiabetes. Selain itu, bermanfaat pula untuk mengobati osteoporosis atau krepitas tulang, penyakit kuning, alergi terhadap cat, sakit karena sengatan lipan, sakit karena sengatan lebah, sakit karena gigitan ulat bulu, dan anemia. Daun dan batang bayam merah juga dapat digunakan untuk memelihara kesehatan kulit, menyembuhkan luka bakar, mempertahankan kebugaran tubuh, dan mengobati sakit pada kepala (Dalimarta, 2005).

F. Landasan Teori

Penelitian Jayaprakasam, *et al* 2004 menyatakan bayam merah memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dengan IC₅₀ sebesar 39,2 µg/ml. Bayam merah mengandung beberapa senyawa kimia salah satunya adalah

flavonoid (Wiyasihati, 2016). Flavonoid dapat memicu terjadinya apoptosis sel dengan menghambat ekspresi enzim topoisomerase I dan topoisomerase II. Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan menyebabkan DNA terpotong kemudian mengalami kerusakan, sehingga pertumbuhan sel kanker terhambat (Ren *et al.*, 2003).

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori di atas maka hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak air bayam merah mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.
2. Ekstrak air bayam merah mampu menginduksi apoptosis sel kanker T47D.