

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker payudara adalah penyakit yang menyebabkan sel-sel dalam tubuh untuk berubah dan menyebar di luar kendali yang dimulai pada jaringan payudara yang terdiri dari lobulus, saluran yang menghubungkan lobulus ke puting susu, jaringan lemak, jaringan ikat, dan jaringan limfatik yang akhirnya membentuk benjolan atau massa yang disebut tumor (*American Cancer Society*, 2017). Berdasarkan data *Global Cancer Observatory Fact*, kanker payudara menduduki peringkat 1 di antara kanker yang lainnya di Indonesia dimana tingkat usia standar kanker payudara per 100.000 adalah 42,1 dan jumlah kasus baru pada 2018 adalah 58.256 kasus (16,7%) (IARC, 2018).

Sebagian besar penderita kanker payudara berobat dengan keadaan stadium lanjut sehingga mengakibatkan rendahnya angka survival (De Santis *et al.*, 2014). Penemuan obat-obat kemopreventif dan alternatif banyak dilakukan untuk penelitian kanker. Kemopreventif merupakan suatu upaya untuk mencegah, menunda, ataupun melawan perkembangan sel kanker menggunakan bahan alam, sintesis, atau kombinasi dari keduanya (Sharma, 2012). Oleh sebab itu, upaya penemuan agen kemopreventif dengan target spesifik perlu ditingkatkan.

Tanaman yang memiliki aktivitas antikanker yaitu daun mangga (*Mangifera indica* L.). Penelitian Abdullah *et al.*, (2014) membuktikan ekstrak etanol kernel biji *Mangifera indica* L. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel

MCF-7 dan MDA-MB-231. Barreto *et al.*, (2008) mengidentifikasi senyawa polifenol pada akar, batang, buah serta daun mangga yaitu mangiferin. Senyawa mangiferin terdeteksi tertinggi pada daun muda 172 g/kg dan daun tua sebanyak 94 g/kg (Barreto *et al.*, 2008). Mangiferin tertinggi terlarut pada metanol dibandingkan etanol dan aceton pada ekstrak daun mangga (Shinde *and* Chavan, 2014).

Mangiferin terbukti dapat memodulasi induksi apoptosis dengan mengatur penurunan ekspresi Bcl-2 dan peningkatan ekspresi Bax pada sel kanker nasofaring CNE2 (Pan *et al.*, 2014). Mangiferin dan asam gallat dapat menghambat aktivasi jalur NF-kB IKK α/β (Núñez Selles *et al.*, 2014). Berbagai transfaktor NF-kB mengaktifkan transkripsi anggota anti-apoptosis dari keluarga Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL dan BFL1), yang menghambat berbagai protein pro-apoptosis (Werner *et al.*, 2002). Terhambatnya ekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 ini selanjutnya akan meningkatkan jumlah protein pro-apoptosis dan dapat menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria kemudian menginduksi jalur caspase sehingga terjadi apoptosis (Simstein *et al.*, 2003).

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh ekstrak metanol daun mangga terhadap efek sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 serta pengamatan ekspresi protein melalui uji imunositokimia untuk mengetahui penurunan ekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 yang terlibat dalam proses apoptosis (kematian sel) dari aplikasi bahan alam tersebut dengan *software ImageJ*.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka perumusan masalah penelitian adalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak metanol daun mangga memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 ?
2. Apakah ekstrak metanol daun mangga dapat menurunkan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah, dapat ditetapkan tujuan penelitian sebagaiberikut:

1. Membuktikan ekstrak metanol daun mangga memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Membuktikan pengaruh ekstrak metanol daun mangga terhadap penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yaitu :

1. Memberikan bukti ilmiah adanya efek sitotoksik ekstrak metanol daun mangga serta pengaruhnya terhadap penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7.
2. Menambah data ilmiah mengenai ekstrak metanol daun mangga sebagai agen kemopreventif dalam pengobatan kanker payudara.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah penyakit yang menyebabkan sel-sel dalam tubuh untuk berubah dan menyebar di luar kendali yang dimulai pada jaringan payudara yang terdiri dari lobulus, saluran yang menghubungkan lobulus ke puting susu, jaringan lemak, jaringan ikat, dan jaringan limfatik yang akhirnya membentuk benjolan atau massa yang disebut tumor (*American Cancer Society*, 2017).

Kanker merupakan suatu penyakit genetik yang disebabkan oleh akumulasi sejumlah mutasi sehingga sel membelah secara berlebihan menjadi sel tumor yang tidak sensitif terhadap kontrol seluler. Hal ini menyebabkan tidak berfungsinya mekanisme regulasi sehingga pertumbuhan sel tidak terkontrol karena sel mampu memenuhi sinyal pertumbuhannya sendiri dan tidak responsif terhadap sinyal apoptosis. Proses selanjutnya menyebabkan sel mampu menginvasi jaringan sekitarnya serta menyebar (metastasis) ke bagian tubuh yang lain (Sarasini, 2003).

Sel kanker mampu mencukupi sinyal pertumbuhan untuk dirinya sendiri. Di sisi lain sel ini tidak sensitif terhadap sinyal penghambat pertumbuhan. Akibatnya sel kanker akan terus berproliferasi. Kemampuan berproliferasi sel kanker juga diakibatkan oleh adanya enzim telomerase yang mampu menjaga integritas kromosom, sehingga membuat sel ini menjadi immortal. Sel kanker mampu menghindari dari program bunuh diri sel

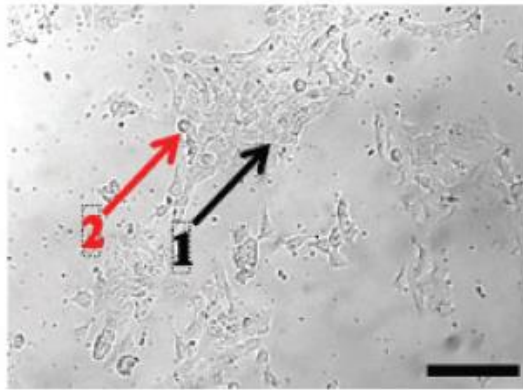
(apoptosis). Sel akan terus hidup dan berkembang, sehingga untuk mencukupi asupan nutrisi sel kanker akan memacu pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis). Sel kanker dapat berpindah ke jaringan lain (metastasis). Ketidakstabilan genomik pada sel kanker dapat menghasilkan mutasi acak. Memiliki kemampuan meningkatkan inflamasi. Menderegulasikan energetika seluler dalam rangka mendukung pertumbuhan sel terus menerus dan proliferasi. Sel kanker juga mampu menghindar secara aktif dari serangan dan eliminasi oleh sel imun pada tubuh (Hanahan *and* Weinberg, 2011).

Salah satu faktor risiko kanker payudara adalah faktor keturunan, 5-10% kanker payudara disebabkan mutasi genetik yang diturunkan. Sejumlah 60-70% dari keseluruhan kanker payudara karena keturunan melibatkan gen *BRCA-1 (Breast Cancer Gene-1)* dan *BRCA-2 (Breast Cancer Gene-2)*. Wanita dengan mutasi pada kedua gen tersebut kemungkinan akan mengalami kanker payudara dengan faktor risiko sebesar 50-80% (Arun *and* Hortobagyi, 2002).

2. Sel MCF-7

Sel MCF-7 atau *Michigan Cancer Foundation line 7* merupakan sel kanker yang diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang pasien wanita kaukasian yang berusia 69 tahun dengan golongan darah O (ATCC, 2018). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Aouali *et al.*, 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), *overekspresi* Bcl-2 (Amundson *et al.*, 2000) dan tidak mengekspresikan *caspase-3* (Onuki *et al.*, 2003). Penggunaan MCF-7 sebagai model *in vitro*

sangat menarik untuk mempelajari mekanisme kemoresistensi karena banyak jalur *cell survival* dan jalur kematian sel telah diketahui (Simstein *et al.*, 2003). Morfologi sel kanker payudara MCF-7 dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Sel Kanker Payudara MCF-7 (Dokumentasi pribadi)

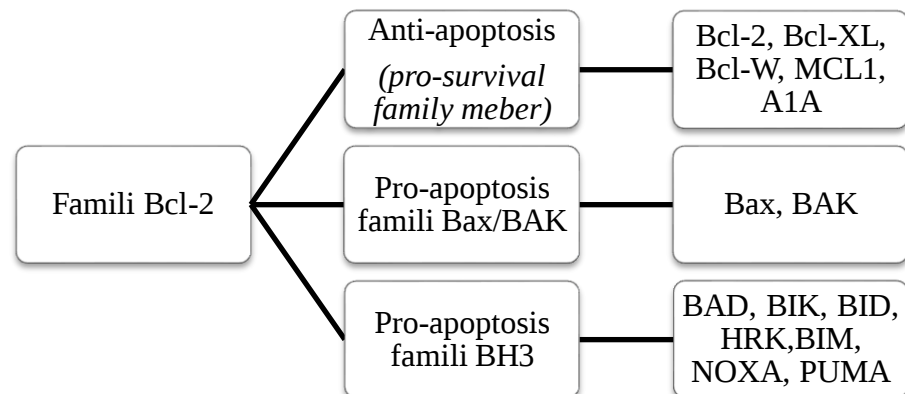
Tanda Sel → 2 Sel yang mengalami perubahan morfologi. → 1 Sel hidup.

3. Protein Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma-2*)

Ekspresi dan dimerisasi keluarga protein Bcl-2 mempengaruhi sensitivitas sel terhadap regulasi apoptosis melalui pengaturan pelepasan sitokrom c, yang mendahului aktivasi *caspase* (Simstein *et al.*, 2003).

a. Famili Bcl-2

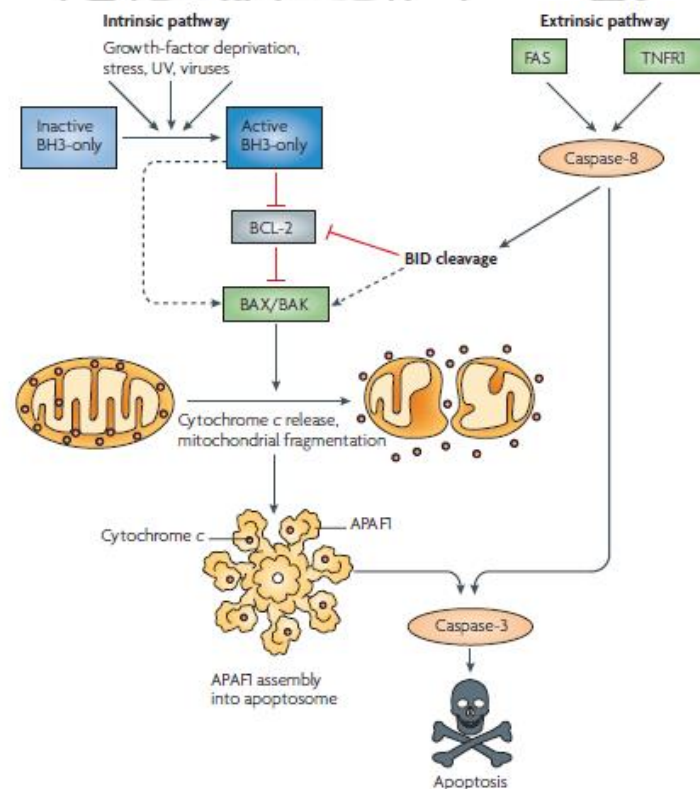
Keluarga protein Bcl-2 dibagi menjadi tiga kelompok, anti-apoptosis (*pro-survival family member*), pro-apoptosis anggota keluarga BAX/BAK dan pro-apoptosis protein BH3 (Gambar 2) (Youle and Stasser, 2008).



Gambar 2. Golongan famili protein Bcl-2 (Youle and Stasser, 2008).

b. Peranan Bcl-2 dalam Proses Apoptosis

Proses apoptosis suatu sel terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur intrinsik (mitokondrial) dan jalur ekstrinsik (penghantaran sinyal secara langsung) (Gambar 3) (Youle and Stasser, 2008).



Gambar 3. Proses apoptosis sel melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik (Youle and Stasser, 2008)

Jalur ekstrinsik melibatkan aktivasi reseptor kematian, Fas dan reseptor TNF, sedangkan jalur intrinsik melalui aktivasi beberapa *procaspase* dan pelepasan faktor apoptogenik dari mitokondria ke dalam sitoplasma (Zhang *et al.*, 2004). Mekanisme apoptosis secara ekstrinsik dimulai dengan pengikatan ligan dengan reseptor dari famili *Tumour Necrosis Factor* (TNF), seperti Fas dan TNFR-1, yang diikuti dengan pengikatan *Fas-associated Death Domain* (FADD) (Goldie *et al.*, 2005). FADD yang telah melekat pada reseptor kematian kemudian berikatan dengan *procaspase-8* (*caspase-8* dalam bentuk inaktif). Molekul-molekul *procaspase-8* akhirnya saling mendekat dan memecah untuk menghasilkan *caspase-8* yang aktif. *Caspase-8* merupakan *spase inisiator* yang akan mengaktifasi *caspase* eksekutor melalui *procaspase-3* (Kumar *et al.*, 2000).

Stimulasi reseptor kematian sebenarnya sudah cukup untuk menimbulkan apoptosis, namun pada sel dengan induksi *caspase* yang tak memadai untuk terjadinya apoptosis sesudah adanya stimulasi Fas, memerlukan inisiasi *caspase* melalui *mitochondrial pathway*. Jalur mitokondria terjadi akibat adanya peningkatan permeabilitas membran mitokondria karena faktor stres seluler yang berlebihan sehingga mitokondria melepaskan molekul-molekul pro-apoptosis seperti sitokrom c dan *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) ke dalam sitoplasma tanpa adanya peran serta reseptor kematian. Sitokrom c akan berikatan dengan *Apoptosis Activating Factor-1* (APAF-1) dan kemudian

merangsang *pro-caspase-9* berikatan dengan kompleks ini untuk membentuk apoptosom. Apoptosom akan mengaktivasi *pro-caspase-9* menjadi *caspase-9* sebagai inisiator apoptosis. *Caspase-9* akhirnya akan mengaktivasi *pro-caspase-3* menjadi *caspase-3* yang merupakan *caspase efektor* sehingga apoptosis dapat terjadi (Talapatra and Thomson, 2001). Pelepasan protein sitokrom c dan AIF diatur oleh famili protein Bcl-2 anti-apoptosis dan pro-apoptosis. Dua protein anti-apotosis utama yang mengatur apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-x. Protein-protein ini normalnya berada di membran mitokondria dan sitoplasma. Bcl-2 atau Bcl-x hilang pada membran mitokondria apabila sel kekurangan sinyal atau terkena stres untuk bertahan hidup. Protein ini kemudian digantikan oleh protein pro-apoptosis yaitu Bak, Bax, dan Bim. Penurunan kadar Bcl-2 atau Bcl-x menyebabkan meningkatnya permeabilitas membran mitokondria sehingga protein yang dapat mengaktifkan *caspase* keluar menuju sitoplasma sehingga menimbulkan apoptosis (Kumar *et al.*, 2000).

4. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat pada simplisia dapat digolongkan kedalam golongan minyak atsiri, alkaloida, fenolik, flavonoida, dll. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang terkandung pada simplisia akan

mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Ditjen POM, 2000).

Metode soxhletasi adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal tersebut menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping soxhlet maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (Ditjen POM, 2000).

5. Uji Sitotoksik dengan MTT Assay

Sitotoksik adalah sifat toksik yang dimiliki oleh suatu senyawa tertentu terhadap sel hidup. Uji sitotoksisitas merupakan uji *in vitro* menggunakan kultur sel untuk menentukan potensi senyawa atau ekstrak yang dapat dikembangkan sebagai obat sitotoksik (Hartati *et al.*, 2003). Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup atau viabilitas sel pada uji sitotoksisitas dapat dilakukan berdasarkan parameter seperti kerusakan membran, gangguan sintesis, degradasi makromolekul, serta perubahan morfologi sel. Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀). Nilai IC₅₀ merupakan besarnya konsentrasi suatu senyawa yang menghasilkan hambatan proliferasi sel (Ernawati, 2010).

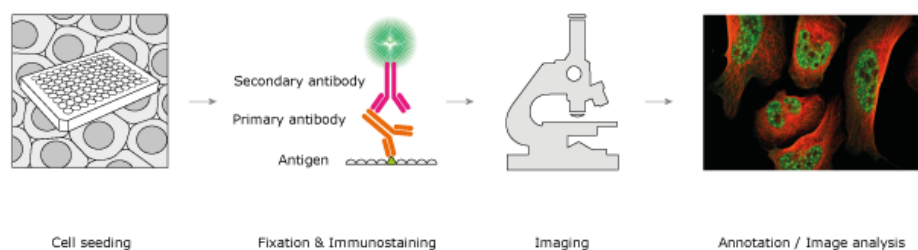
Metode MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)- 2,5 -difenil- tetrazolium bromida) adalah salah satu uji sitotoksitas yang bersifat kuantitatif. Uji ini berdasarkan pengukuran intensitas warna (kolorimetri) yang terjadi sebagai hasil metabolisme suatu substrat oleh sel hidup menjadi produk berwarna (Kupcsik, 2011).

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5 –dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazolium bromida) yang telah diabsorpsi ke dalam sel menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup (Doyle and Griffiths, 2000).

Kristal formazan yang terbentuk pada uji MTT akan diakumulasi ke dalam sel apabila kristal formazan yang dihasilkan tidak mampu menembus membran, sehingga metode ini dapat menunjukkan aktivitas dan integritas mitokondria. Penambahan larutan *stopper* (bersifat detergenik) melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang dihasilkan oleh pembentukan kristal formazan proporsional dengan jumlah sel hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk, maka semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh dan mengindikasikan mortalitas yang rendah (Doyle and Griffiths, 2000).

6. Uji Imunositokimia

Imunositokimia adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya protein atau antigen tertentu dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik. Antibodi digunakan untuk menunjukkan adanya antigen dalam sel. Sampel yang dapat dianalisis dengan metode ini yaitu noda darah, kultur sel, suspensi sel, dan sitospin (*IHC World*, 2018). Metode imunositokimia terdiri dari empat tahap yaitu (1) penanaman sel, (2) fiksasi dan perwarnaan dengan antibodi, (3) visualisasi sel dengan mikroskop, dan (4) analisis ekspresi protein yang telah divisualisasikan (Gambar 4) (*The Human Protein Atlas*, 2018).



Gambar 4. Tahap-tahap dalam metode imunositokimia (*The Human Protein Atlas*, 2018)

Ekspresi protein yang telah divisualisasikan dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengekspresikan protein tertentu dari keseluruhan sel dan dinyatakan dalam satuan persen (%). Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan protein tertentu memberikan warna ungu/biru (CCRC, 2010).

7. Daun Mangga (*Mangifera indica* L.)

a. Deskripsi

Daun tunggal, dengan letak tersebar, tanpa daun penumpu. Panjang tangkai daun bervariasi dari 1,25-12,5 cm, bagian pangkalnya menebal.

Daun mangga tergolong daun tunggal karena pada tangkai daunnya hanya terdapat satu helaian daun saja. Daun mangga berbentuk *lanceolatus* (lanset), daging daunnya *papyraceus* (seperti kertas), tepi daunnya *integer* (rata), ujung daun *acuminatus* (meruncing), pangkal daun *acutus* (runcing), pertulangan daun *penninervis* (menyirip), permukaan daun *scaber* (kasap), dan duduk daun folio *sparsa* (tersebar) (Tjitrosoepomo, 1985).



Gambar 5. Daun mangga jenis bapang (*Mangifera Indica* L.) (Dokumentasi Pribadi)

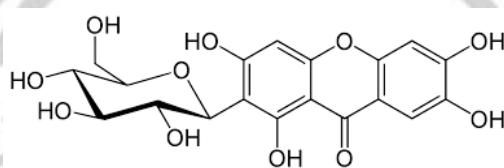
b. Klasifikasi

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales

Famili : Anacardiaceae
 Genus : Mangifera
 Spesies : *Mangifera indica* L. (USDA, 2018)

c. Mangiferin

Mangiferin termasuk golongan polifenol, merupakan xanthon C-glikosida stabil yang mengandung gugus gula. Mangiferin dilaporkan stabil terhadap asam dan hidrolisis enzimatis (Shinde *and* Chavan, 2014).



Gambar 6. Struktur mangiferin (Shinde *and* Chavan, 2014)

Mangiferin termasuk dalam 4 senyawa polifenol utama dari daun *Mangifera Indica* L. selain asam gallat, metil gallat dan penta-O-galloyl glucoside (Barreto *et al.*, 2008). Senyawa utama polifenol mangiferin terdeteksi tinggi pada daun muda 172 g/kg dan daun tua 94 g/kg (Barreto *et al.*, 2008).

d. Khasiat

Daun mangga (*Mangifera Indica* L.) mengandung bioaktif alami salah satunya yaitu mangiferin yang berhasiat sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antikanker (Núñez Selles *et al.*, 2014). Selain itu mangiferin berkhasiat sebagai antioksidan, analgesik, antidiabetes, anti *inflammatory*, antitumor, antimikrobia, dan peningkat stamina atau daya tahan tubuh (Jutiviboonsuk *and* Sardsaengjun, 2010).

F. Landasan Teori

Ekstrak etanol kernel biji *Mangifera indica* L. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dan sel MDA-MB-231 (Abdullah *et al.*, 2014). Senyawa polifenol yang terdapat pada ekstrak metanol daun *Mangifera indica* L. yaitu mangiferin, terdeteksi tinggi pada daun muda sebesar 172 g/kg dan daun tua sebesar 94 g/kg (Barreto *et al.*, 2008).

Mangiferin dan asam gallat menghambat aktivasi jalur NF-kB IKK α/β (Núñez Selles *et al.*, 2014). NF-kB merupakan faktor transkripsi yang sangat berperan dalam pengembangan dan progresi kanker (Sen and Baltimore, 1986). Faktor transkripsi dari Bcl-2 adalah NF-kB. Terhambatnya ekspresi Bcl-2 ini selanjutnya akan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria kemudian menginduksi jalur *caspase* sehingga terjadi apoptosis (Simstein *et al.*, 2003). Mangiferin terbukti dapat memodulasi induksi apoptosis dengan mengatur penurunan ekspresi Bcl-2 dan peningkatan ekspresi Bax pada sel kanker nasofaring CNE2 (Pan *et al.*, 2014).

G. HIPOTESIS

Berdasarkan uraian tersebut dapat dirumuskan hipotesis:

1. Ekstrak metanol daun mangga memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Ekstrak metanol daun mangga mampu penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7.