

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan karena perkembangan sel abnormal yang terus-menerus dan dapat menimbulkan kematian. Kanker yang termasuk dalam kategori lima besar kanker yang mematikan didunia salah satunya kanker payudara. Berdasarkan *Globocan, International Agency for Research on Cancer* (IARC) pada tahun 2012, kanker payudara memiliki presentase kasus tertinggi (43,3%) dan kematian tertinggi (12,9%) pada perempuan di dunia. Prevalensi kanker payudara di Indonesia mencapai 0,5 per 1000 perempuan (Kemenkes RI, 2015). Selama ini banyak upaya untuk mengobati kanker seperti tindakan operasi, kemoterapi, penggunaan obat kimia dan obat tradisional. Pengobatan dengan obat tradisional dipilih karena biaya yang murah dan dirasa cukup aman karena efek samping yang kecil. Pada kasus kanker payudara, salah satu penyebab pertumbuhan tak terkendali sel yaitu adanya aktivasi atau overekspresi beberapa protein, seperti reseptor estrogen (ER) dan c-erbB-2 (HER-2) yang merupakan protein predisposisi. Selain itu, kedua protein juga berperan dalam perkembangan kanker payudara (*early cancer development*). Sekitar 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang tergantung estrogen dan sekitar 30% kasus merupakan kanker yang positif mengekspresi HER-2 berlebihan (Gibbs, 2000). HER-2 pada kanker payudara dapat dibedakan menjadi positif yaitu terjadi overekspresi protein HER-2 dan negatif yaitu protein HER-2 tidak

overekspresi. Penderita kanker payudara yang disertai ekspresi HER-2 positif tinggi, diketahui lebih responsif terhadap pengobatan dibanding yang HER-2 negatif. Sekitar 15-20% kasus penyakit kanker payudara merupakan jenis HER-2 positif (Perou *et al.*, 2006).

Jambu biji (*Psidium guajava* L) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat herbal. Kandungan dari daun jambu biji seperti flavonoid, yaitu kaemferol, morin, luteolin, glucoside, apigenin dan *quercetin*. *Quercetin* dalam daun jambu biji dapat bermanfaat sebagai agen antioksidan dan agen antikanker. Kandungan *quercetin* dalam daun jambu biji lebih tinggi dibandingkan daun *Ginko biloba* yaitu diperoleh *quercetin* sebanyak $\pm 2,15\%$ (Batubara *et al.*, 2017). Penelitian Lema (2014) membuktikan ekstrak daun jambu biji dengan etanol 70% memiliki aktivitas sitotoksik sebesar 35 ppm pada sel kanker payudara MCF-7. *Quercetin* menginduksi peningkatan viabilitas dan proliferasi sel yang signifikan di hadapan Nec-1 dibandingkan dengan keberadaan ZVAD. *Quercetin* juga meningkatkan apoptosis sebagaimana diungkapkan oleh pewarnaan DAPI dan evaluasi morfologi. Setelah pengobatan *Quercetin*, ekspresi Bcl-2 menurun secara signifikan sementara ekspresi Bax meningkat secara signifikan (Khorsandi *et al.*, 2017). *Quercetin* mampu menghambat apoptosis sel kanker payudara MCF-7 dengan mekanisme menurunkan Bcl-2, meningkatkan ekspresi Bax, menurunkan HER-2, dan menghambat jalur PI3K-Akt (Duo *et al.*, 2012). Apoptosis terjadi umumnya melibatkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Kelompok Bcl-2 mengatur permeabilitas mitokondria sehingga saat

penghambatan ekspresi protein Bcl-2 akan menginduksi pelepasan sitokrom c dan menginduksi jalur capcase sehingga apoptosis terjadi (Robbins *et al.*, 2010).

Menarik sekali untuk diteliti apakah ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 yang overekspresi HER-2 dengan pengamatan ekspresi protein melalui uji imunositokimia untuk mengetahui 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 etanol daun jambu biji memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2 ?
2. Apakah ekstrak etanol daun jambu biji mempengaruhi ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2 ?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah, dapat ditetapkan tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Membuktikan ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2.
2. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol daun jambu biji terhadap ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yaitu :

1. Memberikan bukti ilmiah adanya efek sitotoksik ekstrak etanol daun jambu biji serta pengaruhnya terhadap ekspresi protein Bcl-2 terhadap sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2.
2. Menambah data ilmiah mengenai ekstrak etanol daun jambu biji sebagai agen kemopreventif dalam pengobatan kanker payudara.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Payudara dan Sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*)

Sekitar 70% kanker payudara ditandai dengan adanya gumpalan yang biasanya terasa sakit dan beberapa timbul gejala seperti pembesaran dan rasa gatal pada puting payudara, timbul kemerahan dan pembesaran atau penyusutan pada payudara. Kanker ini terjadi akibat penyerangan pada membran mukosa yaitu sebanyak 86% pada kelenjar payudara terutama pada *ductus* (saluran yang menyalurkan susu) dan 14% pada *lobus* (kelenjar susu tempat produksi susu) (Keitel and Kopala, 2002). Hormon memiliki peranan penting terjadinya kanker payudara, seperti estradiol dan progesteron dalam daur normal menstruasi yang dapat meningkatkan resiko kanker payudara. Sel MCF-7 adalah sel kanker yang diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun, golongan darah O dengan Rh positif. Sel menunjukkan adanya diferensiasi pada jaringan epitel *mammae* termasuk diferensiasi pada sintesis estradiol. Media penumbuh sel MCF-7 yaitu media DMEM terformulasi dengan

ditambahkan 0,01 mg/ml *bovine insulin* dan FBS hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan dengan kadar CO₂ 5%. Sel MCF-7 tergolong *cell line adherent* (ATCC, 2008).

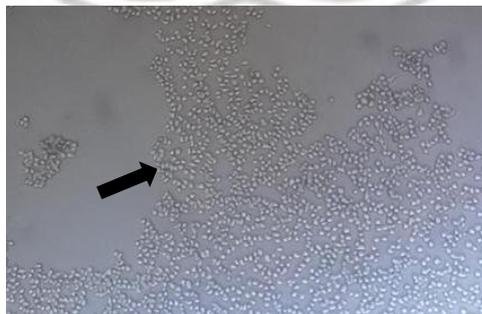
2. *Human Epidermal Receptor-2 (HER-2)*

Human Epidermal Receptor-2 (HER-2 atau HER-2/neu) merupakan salah satu anggota dari *erbB/epidermal growth factor receptor (EGFR)* /reseptor tirosin kinase kelas I. Gen HER-2 menyandi 185 kDa reseptor sehingga HER-2 juga dikenal sebagai p185 HER-2. Protein HER-2 mempunyai karakteristik struktur yang terdiri dari ligan ekstraseluler (*extracellular ligandbinding domain*), suatu transmembran, *tyrosine kinase domain*, dan ujung karboksil terminal. HER-2 adalah salah satu dari empat anggota keluarga HER dari reseptor tirosin kinase transmembran. Jalur transduksi sinyal HER-2 melalui dimerisasi dan autofosforilasi dengan reseptor lain dari anggota HER (HER-1 atau EGFR, HER-3, HER-4). Reseptor HER-2 diketahui memiliki pengaruh dalam proliferasi sel tumor, survival, dan kemampuan menginvasi jaringan dan angiogenesis (Laskin and Sandler, 2004).

HER-2 memiliki peran dalam peningkatan reseptor antiapoptosis Bcl-2 dan survivin melalui aktivasi jalur MAP kinase dan PI3K/Akt. Jalur MAP kinase memiliki kemampuan dalam memfosforilasi IκB sehingga terbentuk kompleks IκB dengan NFκB sehingga NFκB lepas dan menjadi faktor

transkripsi dan masuk ke dalam nukleus sehingga terjadi proliferasi sel (Siddiqa *et al.*, 2008).

Katalisis transfer fosfat dari ATP ke gugus –OH tirosin pada reseptor target merupakan mekanisme kerja dari anggota reseptor kinase, yaitu suatu reseptor transmembran. Aktivasi reseptor tirosin kinase (RTK) terjadi apabila berada dalam konformasi dimer. Dimerisasi RTK menyebabkan terjadinya autofosforilasi pada residu asam amino. Adanya proses automerisasi mampu memicu aktivasi jalur RAS/RAF/MAPK (Konkimalla *et al.*, 2009). Faktor transkripsi NFκB dari jalur MAP kinase mampu mempengaruhi peningkatan ekspresi Bcl-2 dan survivin, suatu reseptor antiapoptosis. Jalur PI3K/Akt mampu mengaktivasi IKK. IKK akan mendegradasi IκB, sehingga faktor transkripsi NFκB bebas dan terjadi proses seperti sebelumnya sehingga sel akan terus membelah dan dibutuhkan konsentrasi agen kemoterapi yang lebih tinggi untuk dapat menghambat proliferasi sel (Siddiqa *et al.*, 2008). Oleh karena itu, penghambatan aktivasi HER-2 pada *ATP binding site* menjadi target pengembangan dalam penemuan obat yang bertarget molekuler pada sel kanker payudara. Morfologi sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2 dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Sel Kanker Payudara MCF-7 overekspresi HER-2 (Dokumentasi pribadi) Tanda Sel → sel hidup.

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

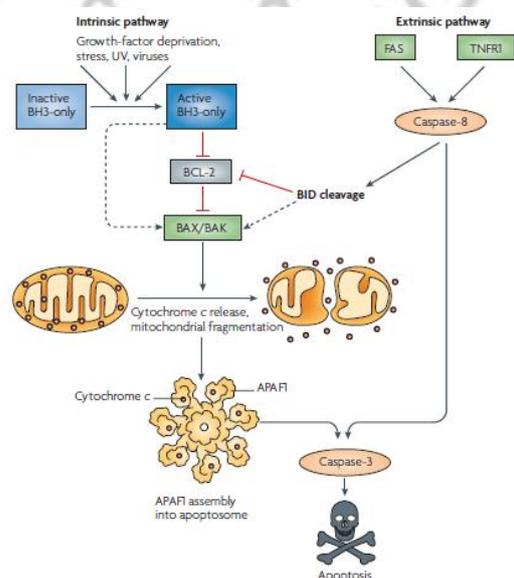
Protein Bcl-2 mengendalikan kematian sel terutama melalui interaksi pengikatan langsung yang mengatur permeabilisasi membran luar mitokondria yang mengarah pada pelepasan protein ruang antarmembran yang ireversibel, setelah aktivasi caspase berikutnya dan apoptosis (Kale *et al.*, 2018).

a. Golongan Bcl-2

Keluarga protein Bcl-2 dibagi menjadi tiga kelompok, anti-apoptosis (*pro-survival family members*), pro-apoptosis anggota keluarga Bax/Bak (*pro-apoptotic BAX/BAK family members*) dan pro-apoptosis BH3 - *only protein* (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 (pengantaran sinyal secara langsung) (Gambar 2) (Youle and Stasser, 2008).



Gambar 2. Proses apoptosis sel melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik
(Youle and Stasser, 2008)

Jalur intrinsik melalui aktivasi beberapa *pro-caspase* dan pelepasan faktor apoptogenik dari mitokondria ke dalam sitoplasma, sedangkan jalur ekstrinsik melibatkan aktivasi reseptor kematian, Fas dan reseptor TNF (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 *pro-caspase-8* (*caspase-8* dalam bentuk inaktif). Molekul-molekul *pro-caspase-8* akhirnya saling mendekat dan memecah untuk menghasilkan *caspase-8* yang aktif. *Caspase-8* merupakan *spase inisiator* yang akan mengaktifasi *caspase* eksekutor melalui *pro-caspase-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-apoptosis 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 (Kumar *et al.*, 2000).

4. Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

a. Klasifikasi Jambu Biji

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Myrtales

Famili : Myrtaceae
Genus : *Psidium*
Spesies : *Psidium guajava* Linn. (Parimin *et al.*, 2005)

b. Deskripsi Jambu Biji

Jambu biji merupakan tanaman perdu bercabang banyak. Tinggi jambu biji antara 3 – 10 m. Batang jambu biji memiliki ciri khas diantaranya adalah berkayu keras, liat, tidak mudah patah, kuat, dan padat. Daun jambu biji mempunyai bentuk bulat panjang, bulat langsing, atau bulat oval dengan ujung tumpul atau lancip. Warna daun beragam yaitu hijau tua, hijau muda, merah tua, dan hijau berbelang kuning. Permukaan daun jambu biji ada yang halus mengkilap dan halus biasa. Tata letak daun saling berhadapan dan tumbuh tunggal. Panjang helai daun jambu biji sekitar 5 – 15 cm dan lebar antara 3 – 6 cm. Sementara tangkai daun jambu biji antara 3 – 7 mm (Parimin *et al.*, 2005). Bunga jambu biji tunggal, bertangkai, keluar dari ketiak daun dengan jumlah 1 – 3 bunga dan berwarna putih. Buah jambu biji berbentuk bulat sampai bulat telur, berwarna hijau sampai hijau kekuningan. Daging jambu biji saat masak bertekstur lunak, berwarna putih kekuningan atau merah jambu. Biji buah jambu banyak menggumpal di tengah, berbentuk kecil, keras, dan berwarna kuning kecoklatan (Dalimartha, 2006). Gambar jambu biji dapat dilihat pada gambar 3.

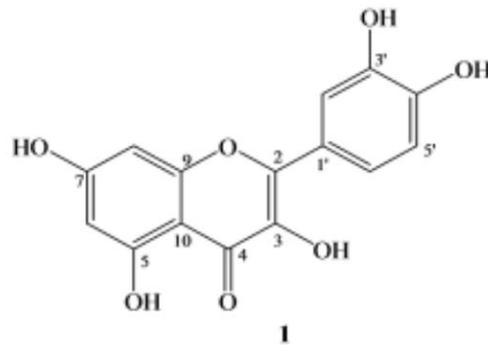


Gambar 3. Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

c. Kandungan Kimia

Daun jambu biji mengandung flavonoid, tanin, minyak atsiri dan juga saponin. Selain itu, terdapat juga senyawa polyphenol seperti *quercetin*, guajavarin, asam galat, leukosianidin 0,1%, heksahidroksidifenil ester dalam bentuk glikosida 0,1%, asam elagat (Sudarsono, 2002).

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang merupakan senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari 2 cincin karbon benzene yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linear yang terdiri dari 3 atom karbon C6-C3-C6 (Srigandono, 1995). *Quercetin* adalah flavonol alami yang terdapat pada sebagian besar buah dan sayuran. *Quercetin* (3,3',4,5,7-pentahydroxyflavone) dapat beraksi sebagai antikanker pada regulasi siklus sel, berinteraksi dengan reseptor estrogen (ER) tipe II dan menghambat enzim tirosin kinase (Lamson *et al.*, 2000). Gambar struktur kimia *quercetin* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. struktur quercetin

5. Uji Sitotoksik menggunakan MTT Assay

Uji sitotoksitas adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antikanker dari suatu senyawa. Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksitas yaitu nilai IC_{50} . Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup atau viabilitas sel pada uji sitotoksitas dapat dilakukan berdasarkan parameter seperti kerusakan membran, gangguan sintesis, degradasi makromolekul, serta perubahan morfologi sel. Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel (Haryoto *et al.*, 2013).

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3 - (4,5- dimetiltiazol -2 -il) -2,5 -difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal

formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup (CCRC, 2009). Sel hidup dapat mereduksi MTT sehingga akan berwarna ungu, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT karena enzim di dalam sel tidak berfungsi lagi dan tidak menunjukkan adanya perubahan warna. Hal ini karena adanya enzim dehidrogenase pada mitokondria yang bekerja pada sel aktif dan memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dan berwarna ungu (Mosmann, 1983).

6. Uji Imunositokimia

Imunositokimia adalah metode yang digunakan untuk mengetahui adanya protein atau antigen spesifik dalam suatu sel baik kultur sel maupun suspensi sel dengan menggunakan antibodi spesifik. Antibodi digunakan untuk menunjukan adanya antigen dalam sel. Pemeriksaan dapat dilakukan di bawah mikroskop. Sampel yang dapat dianalisis menggunakan metode ini seperti, noda darah, sel yang dikultur dan suspensi sel. Tahapan dalam imunositokimia ada 4 yaitu : (1) preparasi sel, (2) fiksasi (3) pewarnaan antibodi dan (4) pengamatan dan analisis hasil (IHC World, 2018).

Ekspresi protein yang telah divisualisasikan dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengekspresi 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).

F. Landasan Teori

Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) merupakan tanaman yang mengandung senyawa bioaktif salah satunya yaitu *quercetin*. *Quercetin* yang ada pada daun jambu biji berpotensi sebagai obat antikanker karena dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker dengan nilai IC_{50} sebesar 35 ppm (Lema, 2014). *Quercetin* dapat menurunkan ekspresi Bcl-2 secara signifikan sementara ekspresi Bax meningkat secara signifikan (Khorsandi *et al.*, 2017). *Quercetin* mampu menghambat apoptosis sel kanker payudara MCF-7 dengan mekanisme menurunkan Bcl-2, meningkatkan ekspresi Bax, menurunkan HER-2, dan menghambat jalur PI3K-Akt (Duo *et al.*, 2012). Faktor transkripsi dari Bcl-2 adalah NF- κ B. Terhambatnya ekspresi Bcl-2 ini selanjutnya akan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria kemudian menginduksi jalur *caspase* sehingga terjadi apoptosis (Simstein *et al.*, 2003).

Penyebab kanker payudara salah satunya yaitu overekspresi HER-2. HER-2 memiliki peran dalam memicu *downstream* jalur RTK yakni jalur RAS, MAPK dan PI3K serta memiliki peran dalam peningkatan reseptor antiapoptosis Bcl-2 dan survivin melalui aktivasi jalur MAP kinase dan PI3K-Akt. Jalur MAP kinase memiliki kemampuan dalam memfosforilasi I κ B sehingga terbentuk kompleks I κ B dengan NF κ B sehingga NF κ B lepas dan menjadi faktor transkripsi dan masuk

ke dalam nukleus sehingga terjadi proliferasi sel abnormal apabila terjadi mutasi pada HER-2 (Siddiqa *et al.*, 2008).

G. HIPOTESIS

Berdasarkan uraian tersebut dapat dirumuskan hipotesis:

1. Ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2.
2. Ekstrak etanol daun jambu biji mampu mempengaruhi penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7 overekspresi HER-2.

