

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak normal dan tidak terkendali yang kemudian akan menginvasi jaringan disekitarnya dan lama kelamaan akan menyerang organ lain (Corwin., 1996). Terdapat beberapa jenis kanker yang menyerang manusia salah satunya adalah kanker payudara. Kanker payudara terjadi karena adanya pertumbuhan jaringan payudara yang abnormal dan memiliki kemampuan metastase (Ramli., 2015). Kanker payudara dengan kasus baru didunia tercatat sebanyak 43,3% dan sebanyak 12,9% terjadi kematian yang diakibatkan karena kanker payudara (Kemenkes., 2015). Penyakit kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013 yaitu sebesar 0,5% (Kemenkes., 2015).

Berbagai macam pengobatan kanker telah dilakukan seperti terapi radiasi, terapi hormonal, terapi antibodi monoklonal, pembedahan, dan kemoterapi (Mitrasinovic dan Mihaljovic., 2008). Akan tetapi, masing-masing metode pengobatan mempunyai kelemahan, sehingga tingkat keberhasilannya masih rendah (King., 2000). Penyebab kegagalan yang sering terjadi pada pengobatan kemoterapi adalah rendahnya selektivitas obat antikanker dan adanya kejadian resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapi (*drug-resistence*) (Wong *et al.*, 2006). Kasus resistensi banyak ditemukan pada obat antikanker payudara, kolon,

prostat dan leukemia (Davis *et al.*, 2003). Oleh sebab itu dibutuhkan alternatif untuk membantu pemeliharaan penyakit kanker payudara.

Eksplorasi bahan herbal merupakan salah satu upaya untuk menemukan agen kemoterapi yang mempunyai daya sitotoksik tinggi dan efek samping rendah. Tanaman yang memiliki aktivitas antikanker yaitu tanaman mangga bapang (*Mangifera indica* L.). Zat aktif yang diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker adalah mangiferin. Senyawa polifenol mangiferin pada *Mangifera indica* L. terdeteksi di akar, batang, buah serta daun. Namun kadar mangiferin tertinggi terdapat pada daun muda yaitu 172 g/kg dan daun tua sebanyak 94 g/kg (Barreto *et al.*, 2008). Penelitian Abdullah *et al.*, (2014) membuktikan ekstrak etanol kernel biji *Mangifera indica* L. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dan MDA-MB-231 dengan nilai IC₅₀ 30 dan 15 µg/mL.

Penelitian Selles *et al* (2014) menyatakan bahwa mangiferin mampu menghambat aktivasi jalur NF-kB. NF-kB adalah faktor transkripsi yang sangat berperan dalam pertumbuhan dan progresi kanker, karena NF-kB mengatur banyak gen yang terlibat dalam inflamasi, *cell survival*, proliferasi sel, invasi, angiogenesis, dan metastasis (Sen dan Baltimore., 1986). NF-kB merupakan salah satu protein yang meregulasi ekspresi gen proapoptosis dan pengatur regulasi sel (Shishoda *et al.*, 2003). Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama yaitu, jalur ekstrinsik atau *death receptor* (DR) pada permukaan sel dan jalur instrinsik atau jalur mitokondria (Martin., 2006). Konformasi membran mitokondria dapat berubah tergantung pada rasio antara protein proapoptosis (Bax) dengan protein anti-apoptosis (Bcl-2) (D'Archivio *et al.*, 2008). Sel MCF-7 merupakan sel kanker

payudara yang memiliki over-ekspresi Bcl-2 sehingga dapat menghambat apoptosis dan cenderung menimbulkan resistensi terhadap agen sitotoksik (Amundson *et al.*, 2000). Igney dan Krammer (2002) menyatakan bahwa ekspresi Bcl-2 mencegah pelepasan Cyt c dari mitokondria dan Bax akan menginduksi pelepasan Cyt c. Penghambatan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dengan induksi apoptosis dapat dilakukan dengan meningkatkan Bax dan Bak serta menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xL (Hsu, *et al.*, 2006). Sangat menarik untuk diteliti apakah ekstrak metanol daun mangga bapang (*Mangifera indica* L.) dapat meningkatkan ekspresi protein Bax pada sel kanker payudara MCF-7 dengan pengamatan melalui uji imunositokimia menggunakan *software ImageJ*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:
Apakah ekstrak metanol daun mangga bapang mampu meningkatkan ekspresi protein Bax pada sel kanker payudara MCF-7?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, dapat ditetapkan tujuan penelitian sebagai berikut:

Membuktikan pengaruh ekstrak metanol daun mangga bapang terhadap peningkatan ekspresi protein Bax pada sel kanker payudara MCF-7.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yaitu :

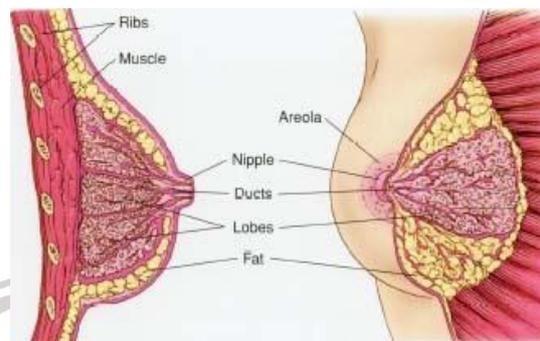
1. Memberikan bukti ilmiah adanya aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun mangga bapang terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Menambah data ilmiah mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun mangga bapang sebagai agen kemopreventif dalam pengobatan kanker payudara.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kanker Payudara

Kanker merupakan suatu penyakit degeneratif yang disebabkan oleh akumulasi sejumlah mutasi sehingga sel membelah secara berlebihan. Secara umum sel kanker terjadi akibat tidak berfungsinya mekanisme regulasi dan tidak responsive terhadap sinyal apoptosis yang kemudian sel akan menginvasi jaringan sekitar dan bermetastasis ke organ tubuh yang lain (Sarasin., 2003). Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Salah satu faktor resiko penyakit kanker adalah faktor genetik, faktor karsinogen yaitu zat kimia, radiasi, virus, hormon, dan iritasi kronis, serta faktor perilaku atau gaya hidup yaitu merokok, pola makan yang tidak sehat, konsumsi alkohol, dan kurang aktivitas fisik (Kemenkes R1., 2015).

Kanker payudara merupakan suatu penyakit genetik dimana sel membelah secara berlebihan serta pertumbuhan jaringan payudara yang abnormal yang berasal dari epitel duktus maupun lobulus (Price., 2005). Berikut ini adalah anatomi kanker payudara yang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Anatomi kanker payudara (Fadjari., 2012)

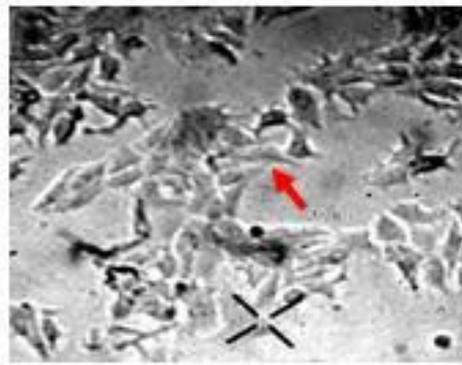
Mekanisme terjadinya kanker payudara terjadi karena mutasi pada gen BRCA1 (*Breast cancer Gene 1*) merupakan gen yang ada pada kromosom nomer 17, sedangkan BRCA2 terdapat pada kromosom nomer 13. Kedua gen tersebut memiliki peranan penting dalam ekspresi protein yang dibutuhkan untuk mengoreksi kesalahan pada tahap sintesis DNA di siklus sel. Apabila gen ini mengalami mutasi maka tidak akan ada protein yang mengendalikan sintesis DNA yang mengakibatkan proliferasi sel. Begitu pula pada protein p53 yang berperan dalam apoptosis, jika terjadi mutasi maka akan menyebabkan tumor atau kanker (King., 2000).

Kanker dapat disebabkan oleh berbagai macam penyebab. 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* dan *brca-2*. Wanita dengan mutasi pada kedua gen tersebut kemungkinan akan mengalami kanker payudara dengan faktor risiko sebesar 50-80% (Arun dan Hortobagyi., 2001).

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. Sel MCF-7 mengekspresikan reseptor estrogen alfa ($ER\alpha$), over ekspresi Bcl-2, dan tidak mengekspresikan caspase- 3. 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). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi karena memiliki over ekspresi *pgp* (Aouali *et al.*, 2003). Berikut ini adalah morfologi dari sel kanker payudara MCF-7 yang dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Morfologi sel kanker payudara MCF-7 (Dokumentasi pribadi)

3. Protein Bax

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram dimana terjadi kematian sel dengan mekanisme fisiologi pengurangan sel yang bertujuan untuk perbaikan jaringan dan pelepasan sel yang rusak, yang dapat membahayakan tubuh (King., 2000). Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama yaitu, jalur ekstrinsik atau *death receptor* (DR) pada permukaan sel dan jalur instrinsik atau jalur mitokondria (Martin., 2006). Bax merupakan protein yang terdapat pada eukariot yang mampu menembus membrane luar mitokondria untuk menengahi kematian sel yang disebabkan oleh apoptosis. Bax diaktifkan oleh prosurvival yang melibatkan interaksi BH3 yang kemudian BH3 memblokir apoptosis dengan mengasingkan protein BH3 (Westphal *et al.*, 2011).

Faktor transkripsi dari Bcl-2 adalah NFkB dari *downstream* P13K/Akt (Simstein *et al.*, 2003). Terhambatnya ekspresi Bcl-2 ini selanjutnya akan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria kemudian menginduksi jalur caspase. Kemungkinan mekanisme lain yaitu melalui peningkatan ekspresi p53. Peningkatan protein p53 ini akan menginduksi ekspresi protein proapoptosis misalnya Bad dan Bax yang akan mengikat Bcl-2 yang ada dipermukaan mitokondria. Selanjutnya terikatnya Bcl-2 oleh Bad atau Bax ini akan memicu keluarnya sitokrom c dari mitokondria dan sama seperti mekanisme sebelumnya, akan terjadi aktivasi jalur caspase dan terjadi proses apoptosis (Fitria *et al.*, 2011).

4. Daun Mangga Bapang (*Mangifera Indica L.*)

a. Deskripsi

Tanaman mangga bapang dengan nama latin *Mangifera indica L.* berasal dari wilayah Indo-Burma. Tanaman ini bisa tumbuh sampai 20 meter atau lebih. Kulit batang mangga bapang berwarna coklat kelabu sampai kehitaman. Kulit dari batang mangga bapang bagian luar memecah atau beralur (Pracaya.,1998). Daun mangga bapang merupakan daun tunggal karena pada tangkai daunnya hanya terdapat satu helaian daun saja dengan letak tersebar, tanpa daun penumpu. Daun mangga bapang berbentuk *lanceolatus* (lanset), tepi daunnya rata, daging daunnya seperti kertas, tulang daun menyirip, pangkal dan ujung daun meruncing. Biasanya daun muda berwarna kemerahan dan akan berubah menjadi hijau gelap mengkilap. Panjang tangkai daun mangga 10 cm, dan bagian pangkalnya menebal (Tjitrosoepomo., 1985). Berikut adalah daun mangga bapang yang dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Daun mangga bapang (*Mangifera indica L.*)(Dokumentasi Pribadi)

b. Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman mangga bapang dapat dilihat dibawah ini (USDA., 2018) :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Mangifera</i>
Spesies	: <i>Mangifera indica</i> L.

c. Kandungan Kimia

Daun *Mangifera indica* L. mengandung flavonoid, fenol, polifenol, asam gallat, metil gallat, mangiferin, quersetin pentosida, isomer isoquersetin (Barreto., 2008). Penelitian Widijanti dan Bernard (2007) menyatakan bahwa tanaman mangga bapang yaitu daun mangga bapang dapat digunakan sebagai antioksidan, antimikroba, dan antitumor. Selain flavonoid tanaman mangga bapang juga mengandung saponin, tanin galat, tanin katekat, kuinon dan steroid atau terpenoid.

d. Khasiat Mangiferin

Mangiferin merupakan bioaktif alami pada tanaman *Mangifera indica* L. yang digunakan sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antikanker (Selles *et al.*, 2014). Mangiferin memodulasi induksi apoptosis dengan mengatur ekspresi Bcl-2 dan Bax pada Sel Kanker Nasofaring CNE2 dengan seri konsentrasi 12.5, 25, 50, 100, 150 dan 200 μ M (Pan *et al.*, 2014).

5. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan zat aktif dalam suatu tanaman ataupun hewan. Dimana terjadi perpindahan zat aktif didalam tumbuhan akan tertarik oleh cairan penyari yang sesuai sehingga didapatkan ekstrak kental (Mukharini., 2014). Beberapa metode ekstraksi yang digunakan adalah dengan cara panas dan dingin. Ekstraksi cara dingin antara lain maserasi dan perkolasi. Sedangkan cara panas ada infundasi, destilasi, dan soxhletasi (Depkes RI., 2000).

Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada sifat dari zat aktif yang akan ditarik, selain itu juga pemilihan pelarut harus disesuaikan dengan kepolaran senyawa aktif yang akan diambil. Penggunaan pelarut dan metode ekstraksi yang tidak tepat dapat menurunkan bahkan menghilangkan efek farmakologis dari senyawa aktif karena senyawa aktif tidak tersari secara maksimal (Depkes RI., 1979).

Soxhletasi merupakan ekstraksi cara panas dimana pelarutnya selalu baru dan kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan.

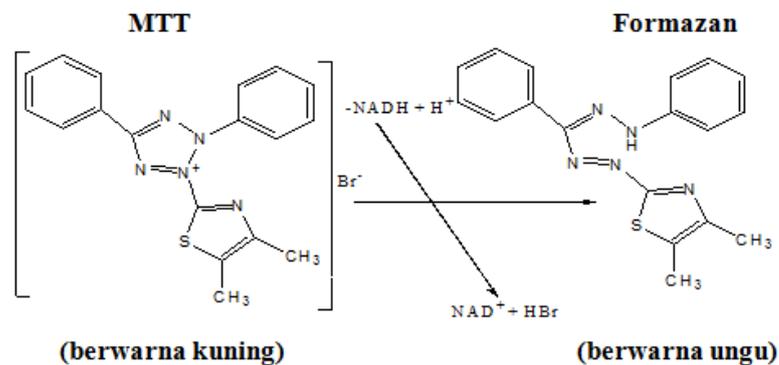
Prinsip kerja dari metode soxhletasi ini adalah bahan dimasukkan kedalam selongsong yang kemudian di aliri pelarut melalui pendingin balik menuju ke pipa sifon dan kemudian akan menetes ke labu alas bulat secara terus menerus hingga pelarut yang merendam bahan dalam selongsong berubah warna dari pekat menjadi jernih (Istiqomah., 2013).

Pelarut yang ideal adalah pelarut yang memiliki kelarutan tinggi sehingga senyawa aktif yang akan ditarik akan tersari secara maksimal (Vogel., 1984). Pelarut yang digunakan yaitu pelarut yang dapat menyari metabolit sekunder pada simplisia dalam jumlah yang besar (Depkes RI., 2008). Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar. Metanol dapat menarik alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman (Thompson., 1985). Jutiviboonsuk dan Sardsaengjun (2010) melaporkan bahwa pada bagian daun *Mangifera indica* terdapat senyawa mangiferin yang merupakan senyawa flavonoid utama pada genus *Mangifera*.

6. MTT Assay

MTT *assay* merupakan teknik secara kolorimetri yang sensitive dengan menggunakan reagen MMT yang didasarkan pada kapasitas enzim dehidrogenase dalam mitokondria sel kanker yang masih hidup untuk mengubah substrat *yellow water-soluble* [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) sehingga membentuk formazan yang berwarna ungu yang kemudian dapat dibaca absorbansinya dalam elisa *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Jumlah formazan yang

dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel dalam *cell lines*. Hasil kristal formazan yang didapatkan pada reaksi tersebut adalah tidak larut dalam air, tetapi larut dalam isopropanol asam dan dalam SDS 10% (Doyle dan Griffiths., 2000). Reaksi reduksi MMT menjadi formazan dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Reaksi Reduksi MTT (Mosmann., 1983)

Spektrofotometer mikro-ELISA *reader* memiliki tingkat ketelitian yang tinggi, sehingga dapat digunakan untuk pembacaan sampel uji dalam jumlah besar (Nikkah *et al.*, 2004).

F. Landasan Teori

Ekstrak etanol kernel biji *Mangifera indica* L. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 30 μ g/mL (Abdullah *et al.*, 2014). Senyawa mangiferin yang merupakan polifenol terdapat pada ekstrak metanol daun tua dan daun muda *Mangifera indica* L. Mangiferin terdeteksi memiliki konsentrasi tinggi pada daun muda 172 g/kg dan daun tua 94 g/kg (Barreto., 2008). Mangiferin terbukti mampu menghambat aktivasi jalur NF-kB (Nunez *et al.*, 2014). NF-kB adalah salah satu protein yang mengatur ekspresi gen proapoptosis dan pengatur

regulasi sel (Shishoda *et al.*, 2003). Konformasi membran mitokondria dapat berubah tergantung pada rasio antara protein proapoptosis (Bax) dengan protein anti-apoptosis (Bcl-2) (D'Archivio *et al.*, 2008). Induksi apoptosis dapat dilakukan dengan meningkatkan Bax dan Bak serta menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xL (Hsu *et al.*, 2006). Mangiferin terbukti mampu menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi Bax pada sel kanker nasofaring CNE2 (Pan *et al.*, 2014).

G. Hipotesis

Ekstrak metanol daun mangga bapang dapat meningkatkan ekspresi protein Bax pada sel kanker payudara MCF-7.

