

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker serviks merupakan kanker kedua di dunia yang paling banyak diderita wanita setelah kanker payudara terutama di negara berkembang seperti Indonesia. *International Agency For Research On Cancer (IARC)* pada tahun 2012 prevalensi kejadian kanker leher rahim sebesar 26 per 100.000 wanita. Angka kejadian untuk kanker serviks pada tahun 2012 ada 528.000 kasus dengan angka kematian 266.000 kasus. Riset Kesehatan Dasar Indonesia mengungkapkan, pada tahun 2013 jumlah kasus kanker serviks di Indonesia meningkat menjadi 98.692 penderita (Kemenkes, 2015).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan pembedahan, kemoterapi maupun dengan radiasi. Efek samping kemoterapi timbul karena obat-obat kemoterapi tidak hanya menghancurkan sel-sel kanker tetapi juga menyerang sel-sel sehat (Noorwati, 2007). Efek samping yang dapat terjadi akibat kemoterapi adalah mual, muntah, diare, stomatitis, alopecia, rentan terinfeksi, trombositopenia, neuropati dan myalgia (NCI, 2007). Pembedahan menyebabkan efek dalam jangka waktu yang lama diantaranya adalah infertilitas, disfungsi seksual, disfungsi kandung kemih, pembesaran kelenjar limfe dan ansietas (Frumovitz, *et al.*, 2005). Terapi radiasi menimbulkan efek dari pengobatan radiasi seperti mual, muntah, iritasi (NCI, 2012). Berdasarkan alasan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengobatan kanker yang selektif dan aman

Salah satunya dengan pengembangan anti kanker dari bahan alam. Sebagian besar bahan alam khususnya tanaman mengandung zat aktif alamiah dengan berbagai aktivitas biologis antara lain sebagai antikanker.

Indonesia merupakan negara yang memiliki keaneka ragaman hayati terutama pada jenis berbagai tumbuhan yang diantaranya mempunyai potensi sebagai tanaman obat namun belum banyak dikembangkan. Daun talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) merupakan salah satu tumbuhan pangan yang dapat dikembangkan sebagai kandidat anti kanker. Penelitian yang telah dilakukan Chakraborty *et al.*, (2015) menyebutkan ekstrak metanol daun talas menunjukkan efek antikanker terhadap *osteosarcoma cell line*. Ekstrak metanol daun talas mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, tanin dan saponin. (Chakraborty *et al.*, 2015). Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis, dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.*, 2003)

Sel HeLa merupakan *continus cell line* yang terinfeksi oleh *Human Papiloma Virus* (HPV). Sel HeLa diketahui mengekspresikan dua onkogen, yaitu E6 dan E7. E6 berikatan dengan p53 yang terfosforilasi sedangkan E7 berikatan dengan protein pRb. Protein p53 adalah suatu faktor transkripsi yang mengaktifasi transkripsi bermacam-macam gen misalnya p21. Protein p53 bertanggungjawab dalam menghentikan siklus sel ketika terjadi kerusakan DNA. Jika kerusakan DNA tersebut tidak dapat diperbaiki, p53 akan menginduksi apoptosis dengan mengaktifasi protein-protein proapoptosis (DeFillippis *et al.*,

2003). Protein Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis yang di aktifkan oleh p53. Induksi ekspresi Bax dan Bak akan menyebabkan peningkatan permeabilitas mitokondria secara langsung (Polyak, *et al.*, 1997).

Berdasarkan berbagai pernyataan dan penelitian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek sitotoksik daun talas melalui induksi apoptosis. Pada penelitian ini digunakan ekstrak metanol daun talas dan dilakukan secara invitro terhadap *cell line* HeLa.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka perumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak metanol daun talas mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa?
2. Berapa besar potensi sitotoksik ekstrak metanol daun talas yang dinyatakan dalam IC_{50} ?
3. Apakah ekstrak metanol daun talas mampu menginduksi apoptosis sel HeLa?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Membuktikan efek sitotoksik ekstrak metanol daun talas terhadap sel HeLa.
2. Mengetahui besarnya potensi sitotoksik ekstrak metanol daun talas pada sel HeLa yang dinyatakan dengan IC_{50} .
3. Membuktikan efek apoptosis ekstrak metanol daun talas terhadap sel HeLa.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yakni :

Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas ekstrak metanol daun talas sehingga diharapkan dapat menambah data dan khasanah khasiat dari daun talas, terutama sebagai agen antikanker dari bahan alam.

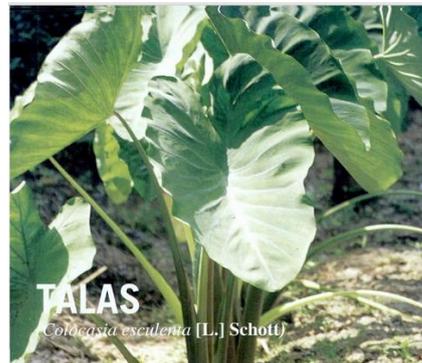
E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott)

Talas merupakan tanaman pangan berupa herba menahun yang termasuk dalam suku talas-talasan (*Araceae*) (Dalimartha, 2006). Habitat tanaman ini diperkirakan berasal dari daerah tropis antara India dan Indonesia. Talas merupakan bahan makanan pokok bagi masyarakat di daerah pasifik seperti New Zealand dan Australia (Matthews, 2004)

a. Deskripsi

Talas merupakan tanaman semusim dengan tinggi 0,3-1,5 m. Batang semu, silindris, batang yang terdapat didalam tanah membentuk umbi, lunak, coklat muda. Daun tunggal, helaian daun berbentuk seperti jantung memanjang, tepi rata, ujung runcing, pangkal berlekuk, panjang 40-60cm lebar 20-30cm, pertulangan menyirip, tebal, permukaan atas tahan air, berwarna hijau tua. Bunga tunggal keluar dari ketiak daun, berwarna putih. Buah buni berbentuk bulat, berwarna kuning. Biji bulat kecil, beralur berwarna hijau (Dalimartha, 2006). Tanaman talas dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Tanaman talas *Colocasia esculenta* L. Schott (Dalimartha, 2006)

b. Klasifikasi

Berikut ini klasifikasi tanaman talas sesuai botani:

Kingdom	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Class	: Monocotyledonae
Ordo	: Arales
Family	: Araceae
Genus	: Colocasia
Species	: <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott.
Nama Umum	: Old cocoyam, Abalong, Taioba, Keladi, Saitomo, Tayoba dan Yu-Tao

(Koswara, 2013)

c. Khasiat

Colocasia esculenta (L.) Schott memiliki aktivitas antifungi, antikanker, hipolipidemia, anti inflamasi, antidiabetes, anti mikroba,

antihepatotoksik, antioksidan dan efektif terhadap bakteri gram positif seperti *aspergillus niger* dan *candida albicans* (Chakraborty, 2015; Halligudi, 2013; Prajapati, 2011). Daun efektif terhadap *salmonella typhi*, *klebsiella pneumonia*, *pseudomonas aeruginosa*, *bacillus Subtilis*, *proteus vulgaris* dan *E.coli*, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun tanaman ini dapat digunakan untuk mengobati typhoid, pneumonia, otitis, infeksi saluran kemih, dan diare (Dhanraj *et al.*, 2013).

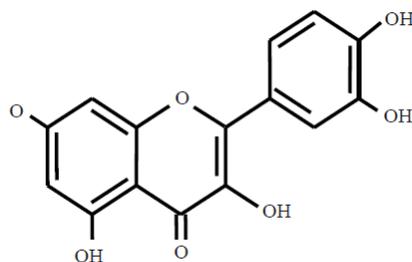
d. Kandungan kimia

Kandungan senyawa aktif yang ada dalam ekstrak daun talas adalah alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan polifenol. Flavonoid yang ada di ekstrak daun talas antara lain orientin, isovitexin, vicenin-2, Orietrin-7-oglukosida, isovitexin 3-glukosida dan sianidin-3- rhamnosida yang memiliki aktivitas antioksidan (Chakraborty *et al*, 2015; Halligudi, 2013). Kandungan lain dari daun talas yaitu mineral dan vitamin seperti kalsium, fosfor, zat besi, vitamin C, tiamin, riboflavin, dan niacin (Sharma *et al.*, 2001)

2. Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan

(Markham, 1988). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa $C_6-C_3-C_6$, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kerangka flavonoid dapat dilihat pada gambar 2 (Robinson, 1995).



Gambar 2. Kerangka $C_6-C_3-C_6$ Flavonoid (Robinson, 1995)

Senyawa flavonoid yang termasuk dalam polifenol dapat berfungsi sebagai antioksidan karena adanya gugus hidroksil yang terikat pada gugus strukturnya. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya aksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas dan mengubahnya menjadi senyawa yang tidak reaktif dan relatif stabil sehingga tidak menyebabkan kerusakan membran dan permeabilitas sel, sehingga sel kanker tidak terbentuk oleh tubuh (Winarsi, 2007).

Flavonoid berperan sebagai agen pencegah tumorigenesis. Pengeblokan aksi karsinogen dapat melalui beberapa mekanisme antara lain melalui inhibisi aktivitas isoenzim sitokrom P450 yaitu CYP1A1 dan CYP1A2 sehingga senyawa karsinogen tidak reaktif. Mekanisme pencegahan yang lain dapat terjadi melalui induksi enzim pemetabolisme fase II yang berperan

penting dalam detoksifikasi senyawa karsinogen. Flavonoid juga meningkatkan ekspresi enzim *gluthation Stransferase* (GST) yang dapat mendetoksifikasi karsinogen reaktif menjadi tidak reaktif dan lebih polar sehingga cepat dieliminasi dari tubuh. Selain itu, *flavonoid* juga dapat mengikat senyawa karsinogen sehingga dapat mencegah ikatan dengan DNA, (RNA), atau protein target (Ren *et al.*, 2003).

Aktivitas antikanker juga ditunjukkan flavonoid melalui induksi apoptosis. Flavonoid menghambat ekspresi enzim *topoisomerase* I dan *topoisomerase* II yang berperan dalam katalisis pemutaran dan relaksasi DNA. Inhibitor enzim *topoisomerase* akan menstabilkan kompleks *topoisomerase* dan menyebabkan DNA terpotong dan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis seperti Bax dan Bak dan menurunkan ekspresi protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-XL. Dengan demikian pertumbuhan sel kanker terhambat (Ren *et al.*, 2003).

3. Kanker leher rahim

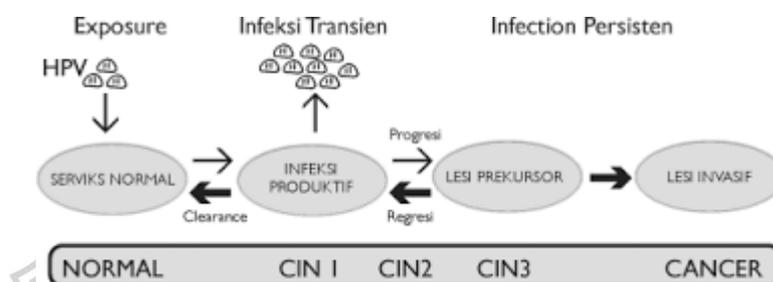
Kanker leher rahim atau kanker serviks termasuk dalam kategori tumor ganas yang timbul di leher rahim wanita. Kanker ini dapat meluas ke vagina, rahim hingga indung telur (Shadine, 2012). Menurut *World Health Organization* (WHO), Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita kanker serviks terbesar di dunia (Kemenkes, 2015). Menurut data *Globocan International Agency for Research on Cancer* (IARC), tahun 2012, diperkirakan 528.000 kasus baru kanker serviks. Di Indonesia, data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan, prevalensi kanker adalah sebesar 1,4 per 1.000 penduduk. Prevalensi tertinggi kanker terdapat di Daerah Istimewa Yogyakarta sebesar (4,1‰), diikuti Jawa Tengah (2,1‰), Bali (2‰), Bengkulu dan Jakarta

masing-masing (1,9%). Penyakit kanker serviks dan kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013. (Kemenkes RI, 2015).

Penyebab utama kanker serviks adalah infeksi virus *Human Papilloma Virus* (HPV). Infeksi HPV mengakibatkan terjadinya integrasi genom DNA HPV dengan host sehingga terjadi gangguan atau hilangnya gen E2 virus yang menyebabkan terekspresinya onkogen virus E6 dan E7. Produk E6 dan E7 menghambat aktivitas tumor supresor p53 dan protein Rb (Chakrabarti, O and krishna, S. 2003). Menurut Cancernet (2001) dalam Price dan Wilson (2005) penelitian epidemiologi di seluruh dunia menegaskan bahwa infeksi HPV adalah faktor penting dalam perkembangan kanker servikal. Lebih dari 20 tipe HPV yang berbeda mempunyai hubungan dengan kanker sekviks. Penelitian memperlihatkan bahwa perempuan dengan HPV 16, 18, dan 31 mempunyai angka *neoplasia intraepithelial servikal* (CIN) yang lebih tinggi. Penelitian terbaru memperlihatkan bahwa perempuan dengan HPV starin 18 memiliki angka mortalitas yang lebih tinggi dan prognosis yang lebih buruk.

Faktor resiko terjadinya kanker leher rahim yang terjadi pada wanita meliputi usia pernikahan yang terlalu dini (kurang dari 18 tahun) atau memulai aktivitas seksual pada usia muda, wanita yang merokok, kebersihan genital yang buruk, wanita yang melahirkan lebih dari 3 kali, wanita dengan aktivitas seksual yang tinggi dan sering berganti-ganti pasangan (Yatim, 2005).

Perkembangan kanker invasif berawal dari terjadinya lesi neoplastik pada lapisan epitel serviks, dimulai dari *neoplasia intraepitel serviks* (NIS) 1, NIS 2, NIS 3 atau karsinoma *in situ* (KIS). Selanjutnya setelah menembus membran basalis akan berkembang menjadi karsinoma mikroinvasif dan invasive (NCCN, 2013) Patofisiologi kanker serviks dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3: Patofisiologi kanker serviks (Depkes RI, 2008)

Operasi atau pembedahan merupakan salah satu upaya penanganan terhadap kanker yang bersifat lokal, yakni dengan cara mengambil atau menghilangkan jaringan tubuh yang terdiagnosis kanker. Upaya pembedahan biasanya dilakukan terhadap sel kanker yang bersifat padat (solid tumor). Secara umum tujuannya untuk mencegah penyebaran sel kanker ke jaringan atau organ lain yang berada disekitarnya. Efek samping dari pembedahan menyebabkan invertilitas, disfungsi seksual, disfungsi kandung kemih, pembesaran kelenjar limfe dan ansietas (Frumovit, M, *et al.*, 2005) Radioterapi merupakan salah satu standar pengobatan kanker dengan menggunakan gelombang energi pengion dan non pengion. Pengobatan radiasi diberikan secara tunggal atau kombinasi dengan pembedahan dan

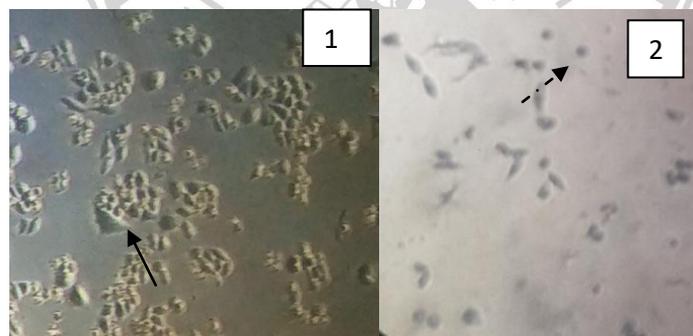
kemoterapi. Tujuan dari pemberian radioterapi pada kanker adalah membunuh sel kanker, memperkecil sel kanker, mengurangi rasa nyeri dan obstruksi serta mengontrol pertumbuhan sel kanker dengan meminimalisir kerusakan pada sel-sel normal pada tubuh. pengobatan dengan radisi menimbulkan efek samping seperti mual, muntah, diare, iritasi, dan bahkan dapat meningkatkan risiko munculnya kanker seperti kanker uterus, ginjal, dan kandung kemih (NCI,2012). Kemoterapi terapi ini diterapkan pada penderita kanker dengan cara konsumsi obat-obatan kimia. Tujuannya adalah menghancurkan sel kanker, mengontrol sel kanker agar tidak tumbuh semakin besar, bermitosis semakin banyak dan menyebar semakin luas. Tetapi terkadang, jenis pengobatan ini menimbulkan efek samping. Selama kemoterapi berlangsung sel-sel tubuh yang sehat pada jaringan tertentu akan terus tubuh dan membelah diri, sehingga akan memberikan efek seperti sering lelah, mual, muntah, diare atau konstipasi, penurunan jumlah sel darah, rambut rontok, sariawan, rasa sakit dibadan dan sebagainya (NCI, 2007).

4. Sel HeLa

HeLa *cell line* merupakan sel turunan yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) manusia. Sel ini diisolasi tahun 1951 dari rahim wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang berusia 31 tahun. Sel ini secara morfologi merupakan sel epitel yang sudah dimasuki oleh *human papilloma virus* (HPV) tipe 18. Sel hela bersifat imortal dan sangat agresif

sehingga mudah untuk dikultivasi tetapi sel ini mudah menginvasi kultur sel lain (Doyle *and* Griffiths, 2000).

Media yang digunakan pada sel hela adalah RPMI 1640 serum. Media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik dan glukosa. Serum mengandung hormon yang memacu pertumbuhan sel, albumin yang merupakan protein transport, lipid yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral yang merupakan kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media RPMI-serum tersebut berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Fresney, 1986)



Gambar 4. Morfologi Sel HeLa

Keterangan: —→ Sel HeLa Hidup
- - → Sel HeLa Mati

(Dokumen pribadi)

Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi *Human Papillomavirus* (HPV 18). Morfologi sel HeLa dengan perlakuan tidak berbentuk atau membulat ditunjukkan panah gambar (4.2) dan tanpa perlakuan berbentuk poligonal ditunjukkan panah gambar (4.1) dapat dilihat pada gambar 5. 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 *and* DiMaio, 2000).

5. Doksorubisin

Doksorubisin merupakan agen kemoterapi golongan antrasiklin yang memiliki aktivitas antitumor spektrum luas (Wattanapitayakul *et al.*, 2005). Penggunaan doksorubisin pada dosis tinggi dan dalam jangka waktu lama juga dilaporkan dapat menimbulkan hepatotoksik (EL- Sayyad *et al.*, 2009). Penggunaan jangka panjang doksorubisin dapat menyebabkan resistensi karena ekspresi berlebih dari P-glikoprotein (Pgp), yakni protein yang berperan pada pengeluaran obat dari sel, sehingga potensi sitotoksik doksorubisin pada sel kanker akan berkurang (Imai, *et al.*, 2005; Wong, *et al.*, 2006).

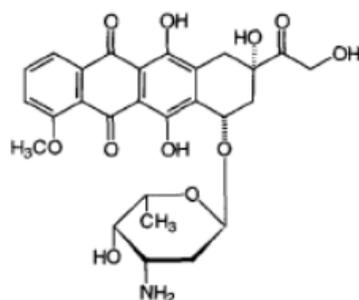
Doksorubisin mempunyai empat mekanisme aksi sitotoksik, yaitu menghambat topoisomerase II, interkalasi DNA sehingga menghambat sintesis DNA dan RNA, peningkatan membran sel yang menyebabkan aliran dan transport ion, pembentukan radikal bebas semikuinon dan radikal bebas oksigen melalui proses yang tergantung besi dan proses reduktif yang diperantarai enzim (Bruton *et al.*, 2005).

Terjadinya cardiomyopathy pada pemakaian doksorubisin kemungkinan juga terjadi akibat peningkatan produksi oksidan di jantung.

Mitokondria diperkirakan merupakan target utama kardiotoxicitas akibat doxorubisin. Di mitokondria elektron tunggal ditransfer ke doxorubisin sehingga menyebabkan peningkatan pembentukan radikal oksigen melalui autooksidasi doxorubisin semiquinon. Hidrogen peroksida juga merupakan penyebab stres oksidatif dan bertanggungjawab pada induksi apoptosis oleh doxorubisin pada sel endotelial dan sel otot jantung. Lebih lanjut, mitokondria berperan dalam pengaturan apoptosis melalui pembebasan sitokrom c (Bruton *et al.*, 2005).

Doxorubisin juga menunjukkan turunya efikasinya pada terapi kanker karena adanya fenomena resistensi obat. Mekanisme yang menyebabkan resistensi doxorubisin adalah adanya overekspresi PgP yang menyebabkan doxorubisin dipompa keluar sel dan konsentrasi doxorubisin dalam sel turun. Perubahan biokimiawi lain pada sel yang resisten doxorubisin antara lain peningkatan aktivitas glutathion peroksidase, peningkatan aktivitas maupun mutasi topoisomerase II, serta peningkatan kemampuan sel untuk memperbaiki kerusakan DNA (Bruton *et al.*, 2005).

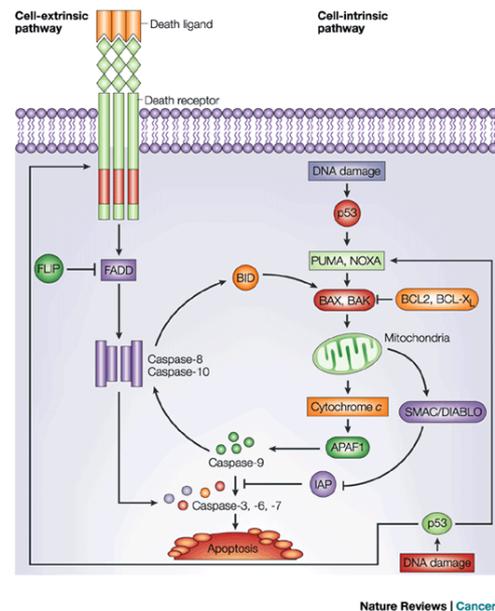
Struktur kimia doxorubisin dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur kimia doxorubisin (Kostrzewa-Nowak *et al.*, 2005)

6. Apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel secara terprogram yang secara normal terjadi selama proses perkembangan dan penuaan semua jaringan di dalam tubuh. Apoptosis berfungsi mengeliminasi sel yang tidak diinginkan atau tidak berguna selama proses pertumbuhan sel dan proses biologis normal lainnya (Wyllie *et al.*, 1993). Pada proses apoptosis ditandai dengan pepadatan dan pemisahan kromatin inti, pengkerutan sel, membrane *blebbing* dan fragmentasi sel untuk menghasilkan badan apoptosis yang kemudian difagositosis oleh makrofag dan didegradasi dalam lisosom (Simstein *et al.*, 2003). Dalam mitokondria terjadi degradasi DNA. Retikulum endoplasma kehilangan strukturnya dan terjadi kehilangan potensi transmembran mitokondria (Chamond *et al.*, 1999). Membran sitoplasma pada sel apoptosis menjadi rusak. Fosfolipid pada membran sel mengubah orientasinya dan terkena paparan lingkungan eksternal. Fragmen dari membrane sel membentuk badan apoptosis yang sebenarnya sisa-sisa sitoplasma yang dikelilingi oleh membran sel. Ketika badan apoptosis yang dilepaskan pada lingkungan eksternal, badan apoptosis difagositosis oleh fagosit sehingga tidak ada area inflamasi (Padanilam, 2003). Tahap-tahap apoptosis perubahan morfologi meliputi kondensasi, perubahan pada struktur inti dan fragmentasi sel menjadi badan apoptosis (Padanilam, 2003).



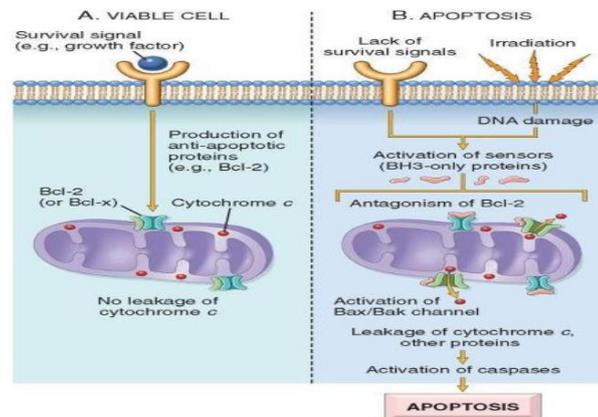
Gambar 6. Mekanisme apoptosis jalur intrinsik dan ekstrinsik

(Kumar, *et al.*, 2007)

Apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik (mitokondria) maupun jalur ekstrinsik (*death receptor*) (gambar 6). Jalur intrinsik umumnya disebabkan oleh sinyal intraseluler seperti kerusakan DNA, glukokortikoid, ceramide dan penurunan faktor pertumbuhan yang menyebabkan perubahan membran mitokondria. Perubahan membran mitokondria menyebabkan pelepasan sitokrom C dan protein apoptogenik seperti AIF (apoptosis inducing factor), smac/DIABLO, endonuclease G, dan serine protease Omi/HTRA2 menuju sitosol. Pada sitosol sitokrom C mengikat caspase-activating protein, Apaf1 (*apoptotic protease-activating factor*), dan kemudian kompleks sitokrom C-Apaf1 mengikat procaspase-9 membentuk struktur poliprotein yang disebut apoptosom. Apoptosom merubah procaspase-9 menjadi caspase-9. Aktivasi caspase-9

ini menginisiasi jalur proteolitik, yaitu caspase-9 memotong dan mengaktifkan *protease effector downstream* seperti procaspase-3. Aktivasi caspase memacu fragmentasi DNA dan digesti protein sel yang menyebabkan gangguan integritas sel diikuti pengkerutan sel, kondensasi kromatin, membrane *blebbing*, dan pembentukan badan apoptosis yang kemudian akan didigesti oleh sel fagosit (Gimenez-Bonafe *et al.*, 2009).

Keluarga B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) turut mengatur dan meregulasi jalur apoptosis mitokondria. Keluarga Bcl-2 terdiri dari protein pro dan anti apoptosis. Protein yang termasuk dalam keluarga pro apoptosis adalah Bax, Bak, dan Bok sedangkan yang termasuk protein anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-XL (Padanilam, 2003). Anggota protein pro apoptosis yang lain adalah keluarga BH3-*only* protein yang dibagi menjadi 2 golongan yaitu “aktivator” yang secara langsung mengaktifkan Bax dan Bak (Bim dan tBid) dan “sensitizer” yang menghambat kerja protein anti apoptosis (Bad, Bik, Bmf, Hrk, NOXA, dan PUMA). Bid merupakan protein penghubung jalur apoptosis mitokondria dan jalur *death receptor*. Permeabilitas membran mitokondria oleh Bax dan Bak melepaskan protein apoptogenik sitokrom C dan Smac, yang kemudian akan mengaktifkan jalur caspase (MacFarlane, 2009; Gimenez-Bonafe *et al.*, 2009). Mekanisme apoptosis jalur instrinsik dapat dilihat pada gambar 7).



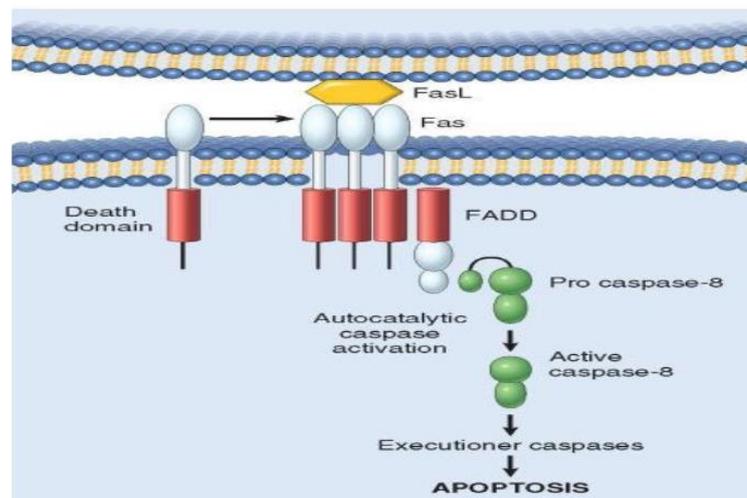
Gambar 7. Mekanisme apoptosis jalur intrinsik .

(Kumar, *et al.*, 2010)

Jalur ekstrinsik diinduksi oleh ligasi (penempelan) suatu ligan (TNF, FasL) pada reseptor kematian (*death receptor*) transmembran yaitu Fas dan tumor necrosis factor reseptor (TNFR-1). Reseptor ini termasuk dalam TNF super *family*. Ikatan ligan oleh reseptornya misal FasL oleh Fas akan menyebabkan trimerisasi dari reseptor fas. Fas akan mengikat suatu protein adaptor yaitu FaDD (*fax associating protein with death domain*) pada *death domain* yang terletak pada sisi sitoplasimik dari resptor dan mengaktifkan caspase 3, 6 dan 7 yang merupakan faktor kunci dalam eksekusi apoptosis (Hakem *and* Harrington, 2005).

Alternatif lain dari aktivasi caspase-8 oleh fas adalah mengaktifkan Bid menjadi bentuk aktifnya yaitu t-Bid (*truncated Bid*). Protein t-Bid akan menginduksi pembentukan pori pada membrane luar mitokondria yang menyebabkan perubahan konformasi Bax. Protein Bax

akan terlokalisasi pada membran luar mitokondria dan akan memacu pelepasan sitokrom C dari mitokondria (Sun *et al.*, 2004). Jalur alternatif menunjukkan bahwa jalur mitokondria dan *death reseptor* saling berhubungan dalam memacu apoptosis. Mekanisme jalur instrinsik dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme apoptosis jalur ekstrinsik.

(Kumar, *et al.*, 2010)

Apoptosis dapat dideteksi dengan pengecatan akridine oranye-etidium bromide. Metode ini berdasarkan pada perbedaan fluoresensi DNA pada sel yang hidup dan mati karena pengikatan akridin oranye-etidium bromide. Metode ini juga dapat membedakan *early* dan *late* apoptosis (McGahon *et al.*, 1995). Akridine oranye akan menembus seluruh bagian sel dan nucleus sehingga tampak berwarna hijau, sedangkan etidium bromide hanya dapat berinterkalasi dengan sel yang membrannya sudah rusak dan nucleus akan berwarna merah. Warna yang

ditimbulkan oleh etidium bromide lebih dominan jika dibandingkan dengan akridin oranye sehingga nucleus pada sel mati akan berwarna oranye (McGahon *et al.*, 1995).

Sel hidup dengan membran yang masih utuh memiliki nucleus dengan warna yang hijau yang seragam. Pada apoptosis tahap awal (*early apoptosis*) membran akan berwarna hijau dengan inti sel berwarna oranye karena telah menjadi membran blebbing sehingga etidium bromide dapat masuk ke dalam sel dan memberikan warna oranye pada inti. Sel yang berada pada tahap akhir apoptosis (*late apoptosis*) akan membentuk badan apoptosis dengan ukuran lebih kecil dibanding sel normal dan berwarna oranye dengan ukuran sel normal (McGahon *et al.*, 1995)

F. Landasan Teori

Tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah talas. Ekstrak metanol daun talas mengandung senyawa kimia antara lain alkaloid, fitosterol, fenol, flavonoid dan tannin (Chakraborty *et al.*, 2015). Kandungan lain dari daun talas adalah mineral dan vitamin seperti kalsium, fosfor, zat besi, vitamin C, tiamin, riboflavin dan niacin (Sharma *et al.*, 2001). Berdasarkan penelitian Chakraborty *et al.*,(2015) ekstrak metanol daun talas memiliki aktivitas antikanker terhadap *cell line osteosarcoma*.

Kandungan senyawa kimia yang memiliki aktivitas antikanker dari daun talas adalah flavonoid. Berdasarkan penelitian Ren *et al.*, (2003). Senyawa flavonoid dapat memicu terjadinya apoptosis sel dengan cara menghambat

ekspresi enzim *topoisomerase* I dan *topoisomerase* II yang berperan dalam katalisis pemutaran dan relaksasi DNA. Inhibitor enzim *topoisomerase* akan menstabilkan kompleks *topoisomerase* dan menyebabkan DNA terpotong kemudian mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis seperti Bax dan Bak serta menurunkan ekspresi protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-XL. Mekanisme induksi apoptosis dari flavonoid terhadap sel HeLa adalah dengan meningkatkan ekspresi p53 sehingga mampu menginduksi protein proapoptosis Bax dan Bak sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga terjadi apoptosis (Polyak *et al.*, 1997).

G.Hipotesis

Dari landasan teori diatas dapat ditarik hipotesis bahwa ekstrak metanol daun talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa melalui induksi apoptosis.