

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hasil Penelitian Terdahulu

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Allen *et al.* (2001) yang berjudul “*Current Status of Phthalocyanines in The Photodynamic Therapy of Cancer*” menyebutkan bahwa *phthalocyanine* merupakan fotosensitizer yang sangat kuat dan memberikan efek pada terapi fotodinamik. Pengobatan antikanker pre klinik secara fotodinamik menggunakan senyawa *phthalocyanine* dapat menginduksi apoptosis sel. Dan seperti yang dilaporkan oleh *The State Research Center for Laser Medicine* (Moscow, Russia) bahwa 85% pasien kanker kulit memberikan respon terhadap terapi fotodinamik dengan *phthalocyanine*.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ormond dan Freeman (2013) yang berjudul “*Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy*” menyebutkan bahwa *phthalocyanine* merupakan fotosensitizer generasi kedua yang memiliki panjang gelombang maksimal 670-700 nm. Pada panjang gelombang tersebut memungkinkan senyawa *phthalocyanine* memiliki kemampuan penetrasi jaringan yang lebih besar dibandingkan dengan fotosensitizer generasi pertama.

Selanjutnya, dalam penelitian yang bersifat eksperimental dengan judul “*Studies about Phthalocyanine Photosensitizers to be used in Photodynamic Therapy*”. Senyawa *Mettalated phthalocyanine* dengan dasar logam diamagnetik disintesis secara kimia menggunakan metode konvensional dengan bantuan *microwave*. Sampel disiapkan dengan pelarut DMSO dan DMF. Penelitian ini bertujuan untuk melihat karakteristik fisikokimia senyawa fotosensitizer yang berpotensi untuk terapi fotodinamik. Hasilnya semua senyawa logam dapat menghasilkan singlet oksigen dengan fotosensitasi hasil kuantum yang berbeda-beda (Staicu *et al.*, 2013).

Kuzyniak *et al.* (2017) melakukan penelitian yang berjudul “*Novel Zinc Phthalocyanine as a Promising Photosensitizer for Photodynamic Treatment of Esophageal Cancer*”. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi senyawa ZnPc sebagai fotosensitizer untuk terapi fotodinamik kanker esophagus dengan menggunakan sel kanker kyse-140 (*Squamous Cell Carcinoma*) dan OE-33 (*Adenocarcinoma*). Hasil yang diperoleh menunjukkan terjadinya penurunan

indeks sel sebesar 68% dari sel kanker yang diinkubasi dengan senyawa ZnPc 5 μM selama 24 jam sebelum PDT. Penyinaran dengan dosis energi cahaya 10 J/cm^2 dapat menurunkan proliferasi sel kanker hingga lebih dari 90% dibandingkan dengan sel control yang tidak diobati. Efek fototoksik tersebut ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh yaitu $1,41 \pm 0,40 \mu\text{M}$ (Kyse-140) dan $3,35 \pm 0,79 \mu\text{M}$ (OE-33).

Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Velazquez *et al.* (2019) yang berjudul “*Effectiveness of ZnPc and of an Amine Derivative to Inactivate Glioblastoma Cells by Photodynamic Therapy*” melaporkan tentang dua senyawa *phthalocyanine* yang dapat membunuh sel kanker otak (glioblastoma) dalam kultur yaitu senyawa *zinc phthalocyanine* (ZnPc) dan turunannya *Zn(II) tetraminephthalocyanine* (TAZnPc). Kedua senyawa tersebut masing-masing dimasukkan dalam sel dan selanjutnya diberikan penyinaran yang pada akhirnya dapat memicu kematian sel melalui proses apoptosis. Mekanisme kematian sel tersebut melibatkan aktivasi *capcase 3* dan hilangnya morfologi dan fungsi mitokondria, serta integritas lisosom. Pada konsentrasi 0,5 μM setelah diinkubasi 18 jam dan diradiasi dengan dosis cahaya 10 J/cm^2 , senyawa ZnPc dan TAZnPc mampu mengurangi viabilitas sel berturut-turut hingga 80% dan 45%. Sedangkan ZnPc dan TAZnPc dengan konsentrasi yang sama yaitu 0,5 μM pada dosis cahaya 27 J/cm^2 mampu mengurangi viabilitas sel hingga 90%.

2.2 Landasan Teori

2.2.1 Kanker

Kanker merupakan satu golongan penyakit yang ditimbulkan oleh sel tunggal yang tumbuh abnormal dan tidak terkendali, sehingga dapat menjadi tumor ganas yang dapat menghancurkan dan merusak sel atau jaringan sehat. Sel-sel kanker membentuk suatu massa dari jaringan ganas yang menyusup ke jaringan di dekatnya (invasif) dan bisa menyebar (metastasis) ke seluruh tubuh (Mulyani dan Nuryani, 2013). Kanker merupakan suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normal sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat, serta tidak terkendali (Shadine, 2012).

Kanker dapat disebabkan oleh dua faktor yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi mutasi gen yang diturunkan, hormone, dan kondisi kekebalan tubuh, sedangkan faktor eksternal yaitu disebabkan oleh gaya hidup seperti mengkonsumsi narkoba dan kelebihan berat badan (American Cancer Society, 2017).

Kanker merupakan penyakit yang terjadi atau timbul dari sel tunggal yang mengalami mutasi. Mutasi gen digambarkan dengan peningkatan pertumbuhan sel yang berlebihan dan proliferasi yang tidak terkendali. Pada awal mutasi, sel akan memisah untuk menghasilkan sel ganda yang homogen secara genetik (Macdonald dan Ford, 1997). Kanker dapat muncul di semua sel atau jaringan tubuh, seperti jaringan ikat, sel paru, sel darah, sel otak, sel kulit, sel hati, dan lain sebagainya (Dalimartha, 2004). Oleh karena itu kanker menurut tempat pertumbuhannya dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu : (Adi, 2007).

1. Karsinoma yaitu sel yang muncul pada lapisan pembatas organ, seperti kanker kulit, kanker kolon, dan kanker mammae.
2. Sarcoma yaitu kanker yang timbul dari jaringan ikat, seperti kanker tulang.
3. Leukemia yaitu jumlah sel dalam darah putih meningkat, seperti kanker darah putih.
4. Lymphoma yaitu kanker yang timbul pada jaringan limfa, seperti limfosarkoma.

Proses pembentukan kanker atau dikenal dengan karsinogenesis merupakan kejadian somatik dan sejak lama diduga disebabkan karena akumulasi perubahan genetik dan epigenetik yang menyebabkan perubahan dalam pengaturan normal kontrol molekuler perkembangbiakan sel. Perubahan genetik tersebut dapat berupa aktivasi proto-onkogen dan atau inaktivasi gen penekan tumor yang dapat memicu pembentukan tumor (Kondo, 1993). Proses pertumbuhan kanker dapat terjadi melalui tiga tahap, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi dan metastatik. Tahap inisiasi merupakan tahap awal yang berlangsung sangat cepat dan terjadi aktivasi onkogen dan inaktivasi gen penghambat tumor (*Tumor Necrosis*

Factor/TNF). Pada tahap ini terjadi perubahan genetik dan kerusakan DNA yang *irreversible* akibat senyawa genotoksik seperti senyawa kimia, radiasi, dan virus berkaitan secara langsung dengan DNA. Tahap promosi merupakan lanjutan dari tahap inisiasi, yaitu perubahan ke arah prakanker (*pre-malignant*) akibat adanya pengaruh dari paparan karsinogen yang berulang-ulang dalam jangka waktu yang lama dan bersifat *reversible*. Tahap progresi merupakan periode antara *pre-malignant* dan kanker, pada tahap ini terjadi kerusakan genetik yang menyebabkan transformasi tumor benigna menjadi maligna. Sel maligna ini kemudian mampu mengalami metastasi ke jaringan lain di seluruh tubuh. Tahap promosi dan progresi memerlukan waktu yang lama untuk berkembang menjadi kanker (Tsao *et al.*, 2004; Walaszek *et al.*, 2004).

2.2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara terjadi ketika sejumlah sel di dalam payudara tumbuh, kehilangan kendali, dan berkembang dengan cepat di dalam jaringan payudara. Kanker Payudara (*carcinoma mammae*) merupakan salah satu kanker yang sangat ditakuti oleh kaum wanita, setelah kanker serviks. Jadi, kanker payudara itu pada prinsipnya adalah tumor ganas yang berasal dari kelenjar kulit, saluran kelenjar, dan jaringan di sebelah luar rongga dada. Payudara secara umum terdiri dari dua tipe jaringan, jaringan glandular (kelenjar) dan jaringan stromal (penopang). Sel kanker payudara dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui dan akan aktif menjadi tumor ganas atau kanker (American Cancer Society, 2016).

Kanker payudara atau *breast cancer* merupakan pertumbuhan sel yang tidak normal pada sel-sel jaringan payudara. Fase awal terjadinya kanker payudara tidak memperlihatkan adanya tanda dan gejala (asimtomatik). Tanda dan gejala yang paling umum dan mungkin terjadi adalah adanya benjolan atau penebalan pada payudara, kemudian pada tingkat lanjut tanda dan gejala yang terjadi meliputi kulit cekung, retraksi atau deviasi puting susu, dan nyeri bahkan puting berdarah. Ditandai dengan

kulit menebal dan pori-pori menonjol sama seperti kulit jeruk atau ulserasi pada payudara, merupakan tanda lanjut dari penyakit kanker payudara. Dan untuk tanda gejala setelah metastatik meliputi anoreksia, nyeri bahu, nyeri pinggang, nyeri punggung bagian bawah atau pelvis, gangguan pencernaan, pusing, penglihatan kabur, dan sakit kepala (Gale dan Charette, 1999).

Berdasarkan asal dan karakter histologisnya, kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu *in situ* karsinoma dan invasif karsinoma. Karsinoma *in situ* dikarakterisasi oleh lokalisasi sel tumor baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma disekelilingnya. Sebaliknya pada invasif karsinoma, membran basal akan rusak sebagian atau seluruhnya dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik (Hondermarck, 2003).

2.2.3 Sel T47D

Sel T47D merupakan *cell line* yang pertama kali diisolasi dari wanita penderita kanker payudara dengan tumor ductal payudara. Sel ini sering digunakan untuk penelitian kanker secara *in vitro* karena penanganannya yang mudah dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas dan homogenitasnya yang tinggi sehingga mudah diganti dengan stok beku apabila terjadi kontaminasi. Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikultur dalam media DMEM ditambah dengan 10% FBS dan 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5% dan suhu 37 °C (Abcam, 2007; CCRC Farmasi UGM, 2015).

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). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

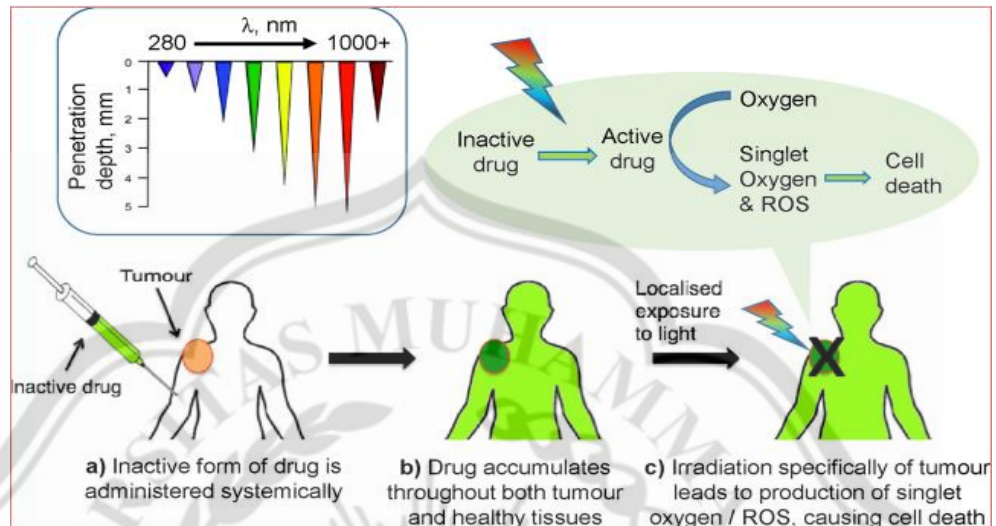
2.2.4 Terapi Fotodinamik (*Photodynamic Therapy / PDT*)

Photodynamic Therapy (PDT) merupakan terapi fotokimia yang digunakan dalam pengobatan kanker. PDT dalam penerapannya melibatkan tiga komponen yaitu cahaya tampak, fotosensitizer (PS), dan oksigen yang jika dikombinasikan akan menyebabkan kematian sel dan jaringan (Manoto dan Abrahamse, 2011; Lin dan Wan, 2014). Panjang gelombang sumber cahaya perlu sesuai dengan fotosensitizer. Hal ini dikarenakan untuk menarik fotosensitizer sehingga mampu menghasilkan radikal atau *reactive oxygen species* (ROS). Salah satu sumber cahaya yang memiliki rentang absorpsi tipe fotosensitizer porfirin adalah *Light-emitting diode* (LED) (Schubert, 2006). Sumber cahaya yang bisa digunakan berada diantara 600-1200 nm disebut jendela optik jaringan, namun untuk PDT efektif pada rentang 620-800 (Agostinus *et al.*, 2011; Straten *et al.*, 2017). PDT memanfaatkan senyawa fotosensitizer (pewarna nontoksik) yang teraktivasi akibat adanya absorpsi cahaya yang menginisiasi pembentukan singlet tereksitasi dan kemudian akan mengalami transisi berupa *long-lived* triplet tereksitasi. Triplet ini akan mengalami reaksi fotokimia jika berikatan dengan oksigen dan membentuk spesies oksigen reaktif yang dapat membunuh sel kanker, mikroba patogen, dan jaringan yang tidak diinginkan. Spesifisitas PDT pada jaringan target menyebabkan cahaya akan terlokalisasi pada daerah tersebut (Abrahamse dan Hamblin, 2016).

Menurut Castano *et al.* (2004) terapi fotodinamik merupakan terapi pengobatan penyakit kanker yang lebih menjanjikan karena sifat selektifitasnya terhadap sel kanker. Selektifitas ini disebabkan karena lokalisasi fotosensitizer dengan iluminasi hanya pada daerah tumor (Gambar 2.1). PDT mengaktivasi obat fotosensitizer sehingga menghasilkan *Reactive Oxygen Species/ROS* seperti oksigen singlet dan radikal anion superoksida yang mampu menginduksi penyusutan tumor atau penghancuran sel dengan apoptosis maupun nekrosis.

PDT memiliki tiga langkah dasar. Pertama, *photosensitizing* berupa obat dalam bentuk cair, krim, atau intravena digunakan atau diadministrasikan ke dalam tubuh. Kemudian, diinkubasi dalam satuan

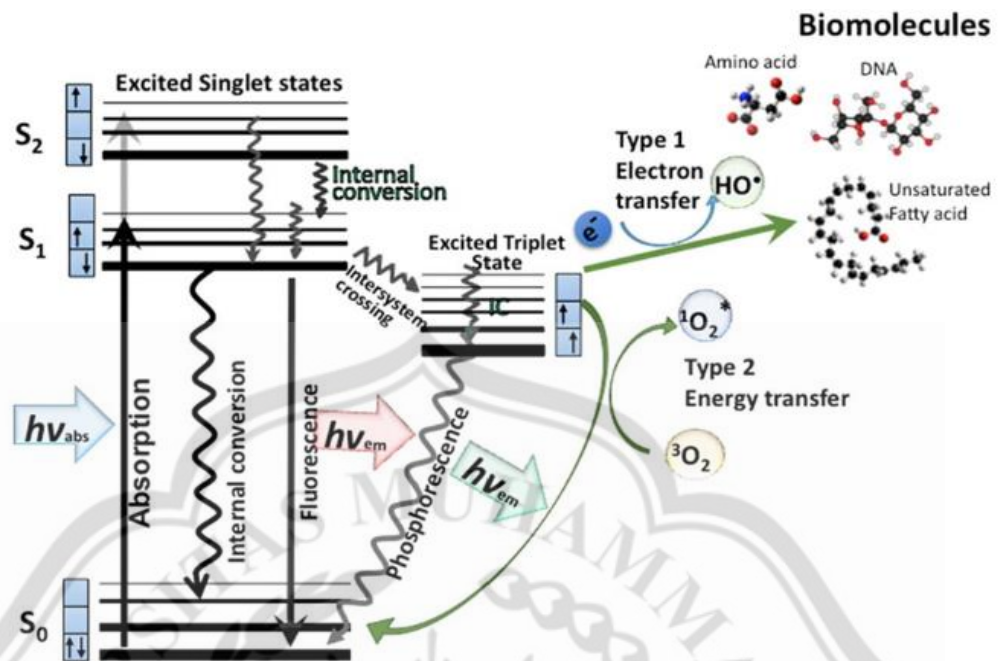
menit atau hari. Selanjutnya, jaringan target dikenai cahaya yang memiliki panjang gelombang spesifik yang akan teraktifkan sebagai pengobatan *photosensitizing* (Moreira *et al.*, 2012).



Gambar 2.1. Ilustrasi PDT pada pasien (McKenzie *et al.*, 2019).

2.2.5 Mekanisme Terapi Fotodinamik (PDT)

Mekanisme pembentukan oksigen singlet (Gambar 2.2) diawali oleh fotosensitizer yang menyerap energi radiasi ultraviolet dan cahaya tampak secara cepat selanjutnya menjadi molekul yang tidak stabil dan tereksitasi. Pada keadaan dasar, fotosensitizer singlet dapat menjadi sensitizer singlet tereksitasi. Kemudian pada keadaan dasar, fotosensitizer singlet tereksitasi dapat kembali ke keadaan dasar fotosensitizer singlet melalui emisi fluoresen atau berubah menjadi fotosensitizer triplet melalui mekanisme penyilangan antar sistem atau *inter system crossing* (ISC). Fotosensitizer triplet tereksitasi dapat kehilangan besar energi melalui energi fosforesen atau melalui reaksi dengan oksigen triplet. Oksigen singlet dapat dibentuk melalui reaksi transfer energi dari triplet tereksitasi ke oksigen triplet melalui mekanisme interaksi triplet-triplet. Waktu hidup fotosensitizer triplet tereksitasi lebih lama dari pada fotosensitizer pada keadaan dasar. Selanjutnya untuk kembali menjadi fotosensitizer pada keadaan dasar dapat memulai siklus lagi untuk menghasilkan oksigen singlet (Min dan Boff, 2002).



Gambar 2.2. Mekanisme PDT, diagram Jablonski (Abrahamse dan Hamblin, 2016).

2.2.6 Senyawa Fotosensitizer

Fotosensitizer adalah obat-obatan yang hanya bekerja setelah diaktifkan oleh cahaya tertentu (Brown *et al.*, 2004). Terdapat beberapa kriteria yang harus dipenuhi untuk menjadi fotosensitizer yang ideal, yaitu senyawa harus merupakan senyawa murni, senyawa memiliki *quantum yield* yang tinggi pada produksi oksigen singlet, senyawa memiliki toksisitas yang rendah atau tidak toksik saat tidak ada penyinaran, senyawa memiliki absorpsi yang signifikan pada panjang gelombang daerah merah (IR), serta senyawa harus mudah terdistribusi pada jaringan tumor dan mudah tereliminasi pada jaringan normal, dan absorpsi dalam daerah spektrum radiasi IR dengan serapan molar yang tinggi ($\epsilon \geq 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sehingga berguna untuk meningkatkan jumlah foton yang diserap dan meningkatkan kedalaman penetrasi cahaya ke jaringan (Pandey dan Zheng, 2000).

Selain itu, pita absorpsi fotosensitizer sebaiknya tidak tumpang tindih dengan pita absorpsi kromofor lain yang ada dalam jaringan. Absorpsi radiasi yang ideal adalah pada panjang gelombang 675-800 nm, karena akan memungkinkan penetrasi cahaya sampai kedalaman 2-3 cm

(Pandey dan Zheng, 2000). Penyerapan foton dengan panjang gelombang lebih dari 800 nm tidak memberikan energi yang cukup untuk eksitasi oksigen ke daerah singlet dan membentuk substansi reaktif oksigen singlet (Agostinis, 2011).

Sebagian besar fotosensitizer yang digunakan dalam terapi kanker yaitu didasarkan pada struktur tetrapirrol makrosiklik, mirip dengan porfirin yang terkandung dalam hemoglobin (Agostinis, 2011). Adanya struktur tetrapirrol makrositik (pengembangan cincin benzena) akan menguatkan absorpsi pada panjang gelombang yang lebih besar (Maiya, 2000).

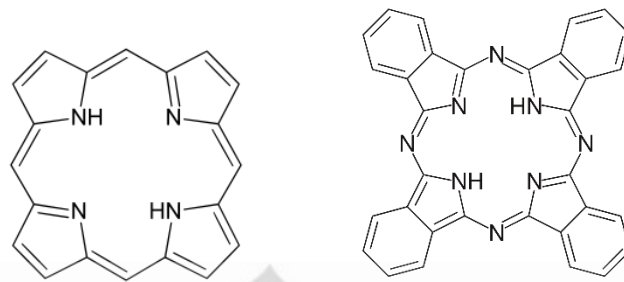
2.2.7 *Phthalocyanine*

Phthalocyanine merupakan turunan dari kerangka porfirin, senyawa makrositik yang sangat berwarna (Gambar 2.3.). *Phthalocyanine* memiliki atom nitrogen yang menghubungkan unit pirol individu. Konjugasi yang diperluas, yang diberikan oleh cincin benzena perifer, memperkuat penyerapannya pada panjang gelombang yang lebih panjang. Penyerapan senyawa ini kuat di gelombang merah (Q band) tumpang tindih daerah penetrasi cahaya maksimum dalam jaringan, sehingga membuat fotosensitizer ini ideal untuk PDT (Tjahjono, 2006).

Phthalocyanine memiliki sifat fisik dan kimia yang luar biasa yang memungkinkan banyak unsur untuk dimasukkan dalam struktur dibandingkan dengan fotosensitizer lain. Fleksibilitas bahan kimianya memungkinkan untuk melampirkan substitusi yang berbeda di posisi perifer dan memungkinkan untuk memiliki banyak kegunaan. *Phthalocyanine* memiliki 16 posisi dimana substitusi dapat terjadi dan sangat mempengaruhi sifat kimianya (Nyamu *et al.*, 2018).

Phthalocyanine secara struktural terkait dengan struktur porfirin. Penyerapan *phthalocyanine* pada panjang gelombang 670-780 nm, yang berarti hampir dua kali lipat lebih kuat dari porfirin (Josefsen dan Boyle, 2012). Dalam penerapannya, *phthalocyanine* membutuhkan formasi kompleks dengan logam karena transisi logam memungkinkan terjadinya *inter system crossing* (Frackowiak *et al.*, 2001). Selain itu, logam pada

phthalocyanine dapat meningkatkan kelarutan *phthalocyanine* dalam air (Mantareva *et al.*, 2016).



(a) Porphirin

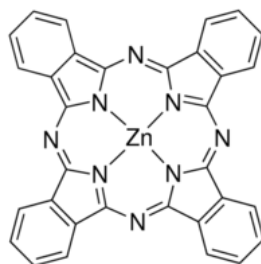
(b) Phthalocyanine

Gambar 2.3. Struktur senyawa Porphirin (a) dan Phthalocyanine (b) (Merck, 2019).

2.2.8 Zinc Phthalocyanine

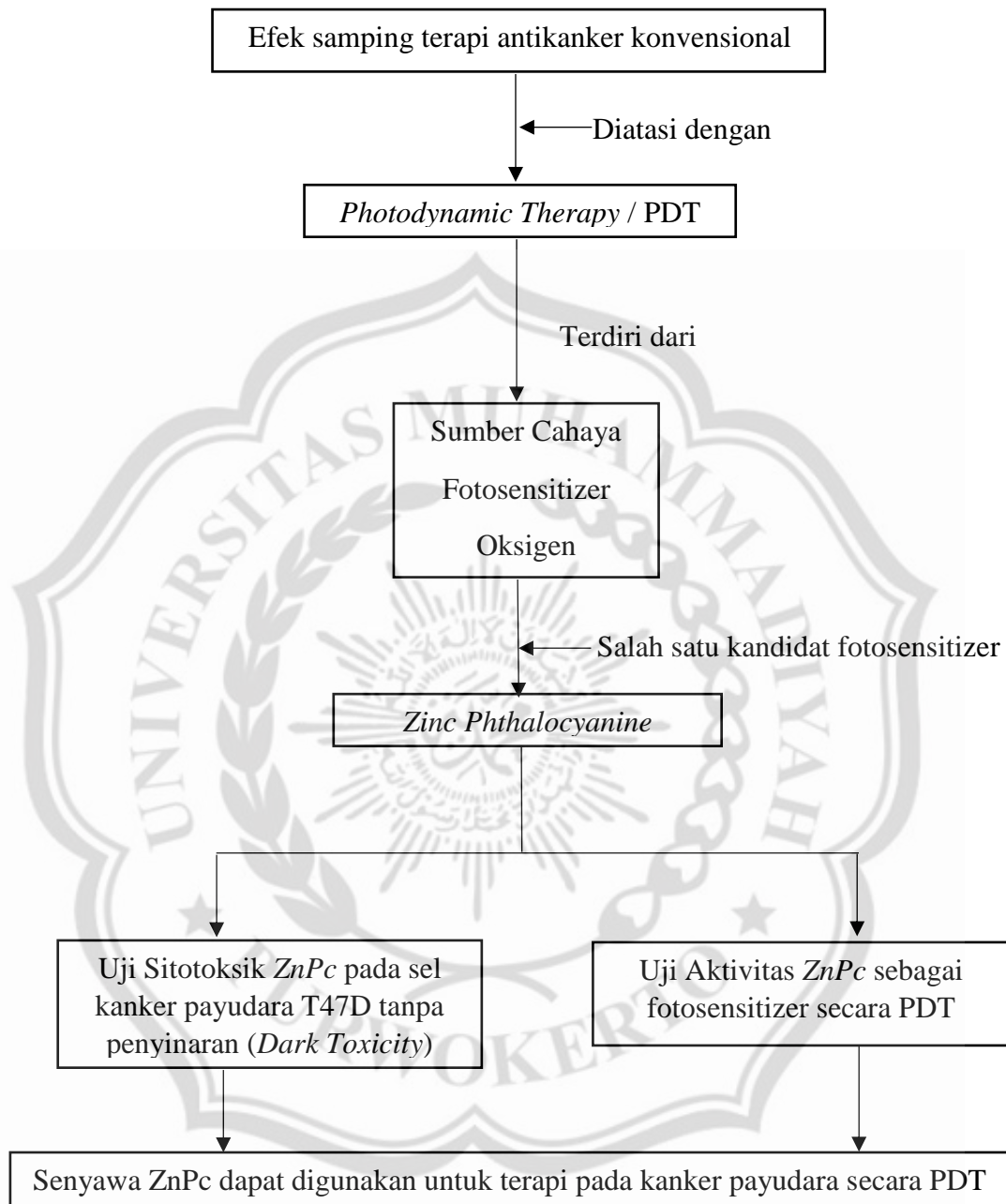
Zinc Phthalocyanine (ZnPc) merupakan turunan senyawa *phthalocyanine* dengan kandungan logam berupa seng (Gambar 2.4.). ZnPc memiliki pita penyerapan Q pada panjang gelombang 670-770 nm yang memungkinkan penetrasi maksimal cahaya ke dalam jaringan (Ocakoglu *et al.*, 2016).

Zinc Phthalocyanine berpotensi untuk PDT karena memiliki fotostabilitas yang baik dan umur *triplet-state* yang relative panjang. Selain itu, absorptivitas molar ZnPc lebih tinggi jika dibandingkan dengan senyawa porfirin seperti protoporphyrin IX sehingga dapat menurunkan dosis untuk pengobatan dan meminimalkan efek samping yang terkait. Kelemahan ZnPc yang membatasi untuk PDT yaitu kelarutannya yang rendah dalam pelarut air dan organik, namun dapat diatasi dengan penambahan ligan di salah satu tempat ikatannya pada ZnPc. penambahan gugus alkil dapat meningkatkan lipofilisitas, dan meningkatkan distribusi jaringan biologis serta volume distribusi (Mehraban *et al.*, 2019).



Gambar 2.4. Struktur senyawa Zn Phthalocyanine (Obata *et al.*, 2015).

2.3 Kerangka Konsep



2.4 Hipotesis

1. Menurut penelitian Kuzyniak *et al* (2017), senyawa *Zinc Phthalocyanine* yang diberi perlakuan dengan penyinaran mampu membunuh sel kanker esophagus (kyse-140 (*Squamous Cell Carcinoma*) dan OE-33 (*Adenocarcinoma*)). Sedangkan tanpa adanya penyinaran, tidak memperlihatkan ukuran sel kanker mengecil. Sehingga dapat ditarik hipotesis bahwa *Zinc Phthalocyanine* tidak memiliki aktivitas antikanker pada sel kanker payudara (T47D) jika tidak diberi penyinaran.
2. Menurut penelitian yang dilakukan Velazquez *et al* (2019) menyebutkan bahwa senyawa *Zinc Phthalocyanine* pada konsentrasi 0,5 μM setelah diinkubasi 18 jam dan selanjutnya diradiasi dengan dosis cahaya 10 J/cm^2 mampu mengurangi viabilitas sel hingga 80% dan pada dosis cahaya 27 J/cm^2 mampu mengurangi viabilitas sel hingga 90%. Sehingga dapat ditarik hipotesis bahwa pemberian senyawa *Zinc Phthalocyanine* dengan penyinaran memiliki kemampuan toksisitas terhadap sel kanker payudara (T47D).
3. Semakin lama waktu inkubasi saat PDT, maka semakin kuat efek sitotoksik senyawa ZnPc.